

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 23 JUL 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:** 102 31 655.4**Anmeldetag:** 12. Juli 2002**Anmelder/Inhaber:** Professor Dr.med. Bernd Karl Friedrich K r e m e r ,
Kiel/DE**Bezeichnung:** Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen monozytären Ursprungs, sowie deren Herstellung und Verwendung**IPC:** C 07 K, C 12 N**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 10. April 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

BEST AVAILABLE COPY

UEXKÜLL & STOLBERG
PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

Prof. Dr. med.
Bernd Karl Friedrich Kremer
Fehmarnwinkel 18

24107 Kiel

DR. U. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE
DIPL.-ING. ARNULF HUBER
DR. ALLARD von KAMEKE
DIPL.-BIOL. INGEBORG VOELKER
DR. PETER FRANCK
DR. GEORG BOTH
DR. ULRICH-MARIA GROSS
DR. HELMUT van HEESCH
DR. JOHANNES AHME
DR. HEINZ-PETER MUTH
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU
DR. BERND JANSEN
DR. ALBRECHT von MENGES
DR. MARTIN NOHLEN
MÜNCHEN
DIPL.-ING. LARS MANKE
RECHTSANWALT IN HAMBURG
DR. FRANK DETTMANN
P 59540 VOE/Gu
Juli 2002

Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen monozytären Ursprungs, sowie deren Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen monozytären Ursprungs, sowie deren Herstellung, und deren Verwendung zur Erzeugung von Transplantat-Akzeptanz.

Vorzugsweise betrifft die Erfindung Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen (im folgenden auch TAIZ genannt), die sich von humanen Monozyten ableiten.

Die Erfindung betrifft ferner den monoklonalen Antikörper GM-7, der spezifisch erfindungsgemäße Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen erkennt, die aus dem Menschen abgeleitet sind. Die Erfindung betrifft außerdem die Verwendung des Antikörpers GM-7 zum Nachweis und/oder zur Selektion von Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen.

Der Begriff "Transplantation" wird in der Immunologie für den Transfer von Zellen, Geweben oder Organen von einem Körperbereich in den anderen verwendet. Der Bedarf für Transplantationen ergibt sich aus der Erkenntnis, daß zahlreiche Erkrankungen

kungen durch die Übertragung (Transplantation) von gesunden Organen, Geweben oder Zellen von einem diesbezüglich gesunden Individuum - dem Donor - auf ein an der jeweiligen Erkrankung leidendes Individuum - den Empfänger oder Wirt - geheilt werden können.

Abhängig von dem Verhältnis zwischen Donor und Empfänger, unterscheidet man die folgenden Transplantattypen:

1. Autologe Transplantate: Hierbei handelt es sich um Gewebe oder Zellen, die innerhalb ein- und desselben Individuums von einem Körperbereich in den anderen transplantiert werden.
2. Isologe Transplantate: Hierbei handelt es sich um den Transfer zwischen genetisch identischen Individuen. Beispiele hierfür sind Inzuchtstämme von Ratten oder Mäusen. Bei Menschen kommen isologe (syngene) Transplantate zwischen genetisch identischen (monozygoten) Zwillingen in Betracht.
3. Allogene Transplantate: Dieser Begriff bezeichnet Transplantate zwischen genetisch unterschiedlichen Mitgliedern der gleichen Spezies, wie beispielsweise von einem menschlichen Individuum zu einem anderen, oder bei Versuchstieren von einem Inzuchtstamm zum anderen.
4. Xenologe Transplantate: Hierbei handelt es sich um den Transfer zwischen verschiedenen Spezies, wie beispielsweise die Übertragung eines Affenherzens in einen Menschen.

In der Regel erzeugen autologe und isologe Transplantate keine immunologischen Probleme im Sinne einer Abstoßungsreaktion. Dies gilt jedoch nicht im Falle von allogenem und xenologen Transplantaten. Derartige Transplantate werden von dem Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und nach verhältnismäßig kurzer Zeit abgestoßen. Bei der allogenem/xenologen Abstoßungsreaktion spielen die T-Lymphozyten (nachfolgend als T-

zellen bezeichnet) eine zentrale Rolle. Diese Zellen erkennen die fremden Zellen anhand von deren Haupthistokompatibilitäts-Komplexen (MHC = major histocompatibility complex). Der fremde MHC-Komplex sensibilisiert die antigen-reaktiven T-Zellen des Empfängers, und anschließend führen die auf diese Weise aktivierten T-Zellen zur Zerstörung der Donor-Zellen bzw. des Spendergewebes. Zellen mit unterschiedlichen MHC-Komplexen werden auch als "MHC-different" bezeichnet.

Die Transplantation von allogenen oder xenogenen Zellen, Gewebe oder Organen führt zwangsläufig zum gemeinsamen Vorhandensein von Zellen zweier unterschiedlicher Individuen, d.h. von MHC-differenten Zellen im Blut des Wirtes. Dieses Phänomen bezeichnet man als "Chimerismus". Man unterscheidet Mikro- und Makrochimerismus. Als Mikrochimerismus wird ein Zustand bezeichnet, bei dem vom Spender abgeleitete Zellen beispielsweise nach Blut- oder Knochenmarkstransfusion oder nach Transplantation Lymphozyten-reicher Organe wie Dünndarm oder Leber, in dem MHC-fremden Wirt zwar persistierend aber nur vereinzelt nachweisbar bleiben. Von Makrochimerismus wird dann gesprochen, wenn mehr als 5% der im Empfänger gefundenen Zellen vom Spender abstammen, wobei in beiden Fällen zwischen Blut- und Organ-Chimerismus mit entsprechendem Nachweis von Spenderzellen im Blut oder in den Organen des Empfängers zu unterscheiden ist.

In gewissem Umfang kann Chimerismus zur Entstehung von Toleranz gegenüber Transplantaten führen. So wurde bei Personen, die sich beispielsweise infolge einer Leukämie oder Lymphomerkrankung einer allogenen Knochenmarktransplantation mit weitgehend übereinstimmendem MHC-Muster zwischen Spender und Empfänger unterziehen mußten, nach entsprechender myeloablativer Konditionierung (Zerstörung des eigenen Knochenmarks und der daraus abgeleiteten Blutzellen) und nachgeschalteter Stammzell-Transplantation, ein "Spenderchimerismus" beobachtet wurde. Bei diesen Patienten stammten mehr als 99% der im Blut nachweisbaren Zellen aus den Stammzellen des Spenders, und dieser Chimerismus bildete die Grundlage für Toleranz gegenüber allen von

diesem Spender transplantierten Organen. Diese Beobachtung wurde in einer Reihe von klinischen Beispielen von nachgeschalteten Nieren-, Leber- und Lungensegmentspenden bestätigt [Dey B., et al., "Outcomes of Recipients of both bone marrow and solid organ transplants: A review." Medicine (Baltimore) 77, 355-369 (1989)]. Für die Toleranzinduktion ist es in diesem Zusammenhang nicht entscheidend, daß ein kompletter Spenderchimerismus - definiert als das Vorhandensein von mehr als 90% Spenderzellen im peripheren Blut eines allogenen Empfängers - vorliegt, sondern es hat sich erwiesen, daß eine Fraktion von 5% Spenderzellen - bezeichnet als "gemischter" Chimerismus - ausreicht, um Toleranz zu induzieren [vgl. Übersicht bei Acho-lonu I.N. und Ildstad S.T., "The role of bone marrow transplantation and tolerance: Organ-specific and cellular grafts", Curr. Opin. Organ. Transplant 4, 189-196 (1999)].

Prinzipiell wurde damit zwar belegt, daß der mit einer Knochenmarktransplantation (KMTx) einhergehende Spenderchimerismus Toleranz induziert, dessenungeachtet war es jedoch bisher nicht möglich, bei vollständig MHC-differenten Spender- und Empfänger-Konstellationen eine erfolgreiche allogene KMTx durchzuführen. Dies beruht auf der Tatsache, daß die hierfür benötigte Vorbereitung, d.h. die Konditionierung des Empfängers (siehe oben), drei wesentliche Gefahren für den Empfänger birgt. Zum einen führt die Knochenmarktoxizität der angewendeten Chemothrapeutika, die mit oder ohne zusätzliche Bestrahlung verabreicht werden, zu einer erheblichen Morbidität; zum anderen besteht die Gefahr der Abstoßung des transplantierten Knochenmarks trotz vorheriger Konditionierung; und schließlich besteht das Risiko einer Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung, bei der sich die mit dem Transplantat in den Wirt übertragenen T-Zellen gegen den Organismus des Wirts wenden (GvHD = graft versus host disease) [vergl. Wolff S.N., "Hematopoietic cell transplant from volunteer unrelated or partially matched related donors: Recent developments." Curr. Opin. Organ. Transplant 5, 372-381 (2000)]. Diese Erkrankung tritt immer dann ein, wenn das Immunsystem des Empfängers durch die vorherige Konditionierung so geschwächt ist, daß die mit dem Knochenmark übertragenen T-Zellen eine letale Abstoßung im Empfänger auslösen können.

Zur Vermeidung der oben aufgezeigten Probleme herrschen derzeit Bestrebungen, die Konditionierung des Empfängers möglichst schwach zu gestalten. Je größer jedoch die MHC-Differenz zwischen Spender und Empfänger ist, desto stärker muß die Konditionierung gewählt werden, um die Abstoßung des transplantierten Knochenmarks zu verhindern; damit steigt gleichzeitig wieder das Risiko der Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (GvHD).

Es ist bisher nicht genau untersucht worden, für welche Zeit der induzierte Chimerismus im Empfängerblut nachweisbar bleiben muß, um eine stabile Toleranzsituation für ein Spenderorgan zu gewährleisten. Zuverlässige Daten aus dem Mausmodell sprechen jedoch dafür, daß bereits ein 2 Wochen lang nachweisbarer Makrochimerismus zur Toleranzentstehung ausreicht [Weckerle, T. et al. "Allogenic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment." Nat. Med. 6, 464-469 (2000)].

Die Notwendigkeit zur Entwicklung von Alternativen zu den derzeit verfügbaren Immunsuppressiva zur Erzeugung von Toleranz ergibt sich unter zwei wesentlichen Gesichtspunkten. Zum einen sind die bisher klinisch verfügbaren Immunsuppressiva nicht in der Lage, die chronische Transplantatabstoßung zu verhindern, und zum anderen gehen mit der permanenten Einnahme von Immunsuppressiva erhebliche Nebenwirkungen einher, die den Patienten gegenüber viralen, bakteriellen und mykotischen Infektionen anfällig machen, und die durch Malignomentstehung und durch Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, insbesondere durch Herzinfarkte und durch Herzinsuffizienz [vgl. Wheeler, D. C. und Steiger, J. "Evolution and Etiology of Cardiovascular Diseases in Renal Transplant Recipients" Transplantation 70, 41-45 (2000)] erhebliche Gefährdungen erzeugen.

Es wird daher dringend ein klinisch umsetzbares Konzept zur Induktion Spender-spezifischer Toleranz benötigt, d.h., ein Konzept, wonach die Immunantwort des Wirts gegenüber den Gewe-

beantigenen, die auf dem von dem Spender übertragenen Organ vorhanden sind, spezifisch unterdrückt wird, bei dem jedoch ansonsten die Immunkompetenz des Wirts vollständig erhalten bleibt.

Durch ein derartiges Konzept würde sich auch mittelfristig eine deutliche Senkung der Diskrepanz zwischen Organbedarf und Organangebot ergeben, da auf diese Weise weitaus weniger Organe durch akute und chronische Abstoßungsvorgänge verlorengehen würden. Der Mangel an verfügbaren Organen sei anhand einer Statistik aus den USA vom Februar 2001 erläutert:

Transplantat-Typ	Zahl der wartenden Patienten
Niere	47.996
Leber	17.151
Bauchspeicheldrüse	1.060
Bauchspeicheldrüseninselzelle	185
Niere-Bauchspeicheldrüse	2.442
Darm	151
Herz	4.222
Herz-Lunge	210
Lunge	3.721
Gesamtzahl der Patienten	74.800

Tabelle 1: Aktuelle Daten aus der "UNOS (United Nations Organ Share Registry) National Patient Waiting List for Organ Transplant (Februar 2001)"

Auf diese Weise erklären sich die immensen nationalen und internationalen Bemühungen, Konzepte für die Induktion Spender-spezifischer Toleranz zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Mittel zur Verfügung zu stellen, mittels derer die T-Zellen des Empfänger-Organismus

auf solche Weise beeinflußt werden, daß sie die jeweiligen fremden Zellen, Gewebe oder Organe langfristig ohne Abstoßung tolerieren bzw. akzeptieren. Die Beschaffenheit dieser Mittel sowie ihre Erzeugung oder Verwendung sollten dabei keine ethischen und/oder rechtlichen Probleme verursachen, und sie müssen schnell für den geplanten Therapieeinsatz in den dazu erforderlichen Mengen und zu vertretbaren Herstellungskosten erzeugt werden können.

Zur Lösung der Aufgabe dienen die erfindungsgemäßen Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen (TAIZ) monozytären Ursprungs aus vertebraten Lebewesen, insbesondere aus Menschen. Erfindungsgemäß hat es sich überraschenderweise gezeigt, daß erfindungsgemäß modifizierte Monozyten aus dem Blut des Spenders (Organ-Donors) in der Lage sind, bei prä- und/oder post-operativer Gabe den Empfängerorganismus vor dessen Körper-eigenen, durch den fremden MHC-Komplex aktivierten T-Zellen zu schützen und damit die Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Die modifizierten Zellen lösen bei bestimmungsgemäßer Verwendung zur Induktion von Transplantat-Toleranz als "zelluläre Therapeutika" keine oder keine nennenswerten Nebenwirkungen im Sinne der zellulären Abstoßung, der Induktion von Tumoren, insbesondere von bösartigen Tumoren, und der Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung in dem jeweiligen Patienten aus.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren zur in vitro Modifikation von Monozyten in solcher Weise führt, daß Zellen erhalten werden, die die Eigenschaften aufweisen, nach der Injektion in einen nicht-immunsupprimierten allogenen Empfänger die natürlicherweise einsetzende Immunantwort gegen Zellen oder Gewebe des Spenders abzuwehren, und die so in der Lage sind, für mindestens 3 Wochen im peripheren Blut zu zirkulieren. Nach Gabe von etwa 10^5 Zellen/kg Körbergewicht (KG) liegt der resultierende Chimerismus im Bereich von 5-20%. Dieser transiente Chimerismus induziert

- a) Langzeitakzeptanz für nachgeschaltete Organtransplantationen vom gleichen Spender, vorzugsweise innerhalb von 10 Tagen nach intravenöser Gabe der Zellen, und
- b) Langzeitakzeptanz in Verbindung mit kurzfristiger immunsuppressiver Behandlung bei Verwendung der Zellen im Anschluß an die Organtransplantation.

Beschreibung der Figuren

- Figur 1: Durchflußzytometrische Bestimmung der Bindungsfähigkeit von GM-7 an monozytäre Ursprungszellen vor (linke Graphik) und nach (rechte Graphik) der erfindungsgemäßen Modifikation der Zellen. Die x-Achse gibt die Anzahl der gebundenen Zellen wieder.
- Figur 2A: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Herztransplantaten nach heterotopen Herztransplantationen mit und ohne prä-operative Gabe von aus dem Spender abgeleiteten TAIZ im Rattenmodell ($n = 10$ Tiere pro Gruppe).
- Figur 2B: Histologisches Präparat eines LEW-Allotransplantats am 150. POT (postoperativen Tag) nach heterotoper Transplantation in das Abdomen einer DA-Empfängerratte, die am Tag -7 mit 10^6 LEW-abgeleiteten TAIZ vorbehandelt worden war. Vergrößerungsfaktor: 40.
- Figur 2C: Histologisches Präparat aus dem Thymus einer mit 10^6 LEW-abgeleiteten TAIZ vorbehandelten DA-Ratte nach Markierung des Präparats mit dem für LEW-MHC-Klasse I spezifischen monoklonalen Antikörper I 1.69. Vergrößerungsfaktor: 40.

Figur 2D: Durchflußzytometrischer Nachweis von Spender-abgeleiteten Zellen in vier nicht immunsupprimierte DA-Empfängerratten nach Injektion von LEW-abgeleiteten TAIZ (Ratten 1-3: 10^6 Zellen / kg x KG; Ratte 4: 10^4 Zellen / kg x KG).

Figur 3: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Herztransplantaten nach heterotopen Herztransplantationen mit und ohne post-operative Gabe von aus dem Spender abgeleiteten TAIZ in Verbindung mit einer initialen Gabe von 4 Zyklen Cyclosporin A (CSA; 5mg/kg xKG) im Rattenmodell ($n = 6-10$ Tiere pro Gruppe).

Figur 4A-C: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Herz- (A), Leber- (B) und Nieren- (C) Transplantaten nach heterotopen (A und C) bzw. orthotopen (B) Transplantationen mit und ohne prä-operativer Gabe von aus dem Spender abgeleiteten TAIZ ($n = 6$ Tiere pro Gruppe).

Figur 4D-F: Histologische Präparate von DA-Transplantaten der Niere (D), der Leber (E) und der Haut (F) nach heterotoper Transplantation in eine LEW-Empfänger-ratte.

Figur 5A: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Herztransplantaten nach heterotopen Herztransplantationen verschiedener Inzuchtstamm-Kombinationen mit und ohne post-operative Gabe von aus dem Spender abgeleiteten TAIZ in Verbindung mit einer initialen Gabe von 4 Zyklen CSA (5mg/kg xKG) im Rattenmodell ($n = 6$ Tiere pro Gruppe).

Figur 5B: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Herztransplantaten nach heterotopen Herztransplantationen 7 Tage nach Gabe von unterschiedlich präparierten Blutmonozyten aus LEW-Spendertieren ($n = 6$ Tiere pro Gruppe).

Figur 6A: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Lungentransplantaten nach orthotopen linksseitiger Lungentransplantationen in Schweinen ("outbred minipigs") unter Verwendung einer Tripleimmunsuppression aus CSA, Azathioprin (AZA) und Steroiden (STE). (n = 4 Tiere pro Gruppe).

Figur 6B: Röntgenthoraxaufnahmen (posterior-anterior-Technik) von zwei einseitig links lungentransplantierten Schweinen ("outbred minipigs") am 41. bzw. 55. POT. Die Tripleimmunsuppression aus CSA, AZA und Steroiden wurde 28 Tage nach Transplantation abgesetzt.

Figur 7A: Gemischte Lymphozytenkultur aus TAIZ eines Individuums B, Responderzellen eines MHC-diskordanten Spenders A und bestrahlten Zellen eines Spenders C. Suppressionswirkung von TAIZ des Individuums B (schwarze Säulen) und unbehandelter Monozyten des Individuums B (graue Säulen). Weiße Säulen: Medium ohne Zusatz von inhibitorischen Zellen.

Figur 7B: Gemischte Lymphozytenkultur aus Zellen eines Individuums B (lymphozytäre Zellpopulation, CD20⁺: graue Säule; monozytäre Zellpopulation, CD14⁺: schwarze Säule), Responderzellen eines MHC-diskordanten Spenders A und bestrahlten Zellen eines Spenders C zum Vergleich der Suppressoraktivität von CD14⁺ und CD20⁺-Zellen.

Figur 7C: Gemischte Lymphozytenkultur aus CD14⁺-Monozyten eines Individuums B (GM-7⁻: graue Säule; GM-7⁺: schwarze Säule), Responderzellen eines MHC-diskordanten Spenders A und bestrahlten Zellen eines Spenders C zum Vergleich der Suppressoraktivität von CD14⁺/GM-7⁺- und CD14⁺/GM-7⁻-Zellen.

Die TAIZ gemäß der Erfindung werden zur Herbeiführung von Transplantatakzeptanz in der Regel in einer Menge von 10^4 - 10^6 Zellen je Kilogramm Körpergewicht, vorzugsweise 10^5 Zellen je Kilogramm Körpergewicht, eingesetzt. Die Gabe der TAIZ kann mehrfach erfolgen, vorzugsweise bei großer MHC-Differenz dreimal im Abstand von etwa 10 Tagen. Die hierzu erforderliche Gesamtzellzahl kann innerhalb von 6 bis 8 Tagen nach Blutabnahme kostengünstig bereitgestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Zellen (TAIZ) haben sich im Tierversuch und in Kultur als risikolos bezüglich der Malignomentstehung erwiesen, ein Ergebnis, welches aufgrund der Natur der monozytären Ursprungszelle, von der die erfindungsgemäßen Zellen abgeleitet sind, auch nicht anders zu erwarten war.

Die wesentlichen Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von TAIZ monozytären Ursprungs umfassen:

- (a) Isolieren von Monozyten aus Blut, vorzugsweise aus humanem Blut;
- (b) Vermehren der Monozyten in einem geeigneten Kulturmedium, welches ein wachstumsförderndes Mittel, vorzugsweise den Makrophagenkolonie stimulierenden Faktor (nachfolgend als M-CSF bezeichnet) enthält; und
- (c) Stimulation der Monozyten mit γ -Interferon (nachfolgend als γ -IFN bezeichnet);
- (d) Gewinnung der in Stufe c) gebildeten Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen durch Abtrennen der Zellen von dem Kulturmedium.

Es konnte erfindungsgemäß gezeigt werden, daß die Stimulierung mit γ -IFN einen entscheidenen Schritt bei der Herstellung der TAIZ darstellt (vgl. Beispiel 7B).

Nach in vitro Kultivierung und Stimulation der Ursprungszellen (Monozyten) mit γ -Interferon entsteht eine Subpopulation von Zellen (60-70% der Gesamtzellen), die den monoklonalen Antikör-

per GM-7 bindet, der von der Hybridomzelllinie DSM ACC2542 gebildet wird. Bei dem monoklonalen Antikörper GM-7 handelt es sich um einen Antikörper vom Immunglobulin Isotyp IgG_{2a}, dessen leichte Kette den kappa-Isotyp besitzt. Charakteristisch für diesen Antikörper ist seine stringente Bindungsfähigkeit an die durch die erfindungsgemäßen Kulturbedingungen modifizierten Monozyten, da die monozytäre Ursprungszelle nicht erkannt wird, d.h. eine Bindung des Antikörpers an die Ursprungszelle findet nicht statt. Darüber hinaus wurde an 20 freiwilligen Probanden gezeigt, daß GM-7 auch nicht an humane Zellen im peripheren Blut bindet.

Der Antikörper wurde durch Immunisieren von Mäusen mit von humanen Monozyten abgeleiteten TAIZ nach dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt (Davis, W.C. "Methods in Molecular Biology: Monoclonal Antibody Protocols", New York: Humana Press Inc. Totowa, 1995). Durch Fusion einer den Antikörper produzierenden B-Zelle und einer Myelomzelle aus der Maus wurde im folgenden eine Hybridomazelllinie hergestellt. Verfahren, die der Herstellung solcher Zelllinien dienen, sind im Stand der Technik bekannt (Davis, W.C. "Methods in Molecular Biology: Monoclonal Antibody Protocols", New York: Humana Press Inc. Totowa, 1995; Kohler, G., Milstein, C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature 256, 495-497 (1975)). Die den Antikörper GM-7 produzierende Hybridomazelllinie wurde nach den Vorschriften des Budapester Vertrages bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) unter der Nummer DSM ACC2542 hinterlegt.

Figur 1 zeigt die in der Durchflußzytometrie ermittelte Bindungsfähigkeit von GM-7 an monozytäre Zellen nach erfindungsgemäßer in vitro Modifikation. Es lässt sich erkennen, daß die direkt aus Buffy-coat gewonnenen CD14-positiven Monozyten den Antikörper GM-7 nicht binden (die grau unterlegte Wolke ist deckungsgleich mit der nicht unterlegten Antikörperkontrolle). Dagegen exprimieren ein Teil der Monozyten nach Kultivierung in

Gegenwart von M-CSF und Stimulation mit γ -IFN ein Antigen, welches vom monoklonalen GM-7 Antikörper erkannt wird. Der monoklonale Antikörper GM-7 wurde als Isotyp κ -IgG_{2a} charakterisiert. Das erfindungsgemäße Verfahren führt somit zur Änderung des phenotypischen Musters der Antigenexpression auf der Zellmembran der modifizierten Monozyten (Figur 1).

Der monoklonale Antikörper GM-7 bindet spezifisch an diejenige Zellpopulation, die unter denjenigen Zellen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugt worden sind, die wirkungsvollste Transplantat-Akzeptanz induzieren (vgl. Beispiel 9). Der erfindungsgemäße Antikörper GM-7 repräsentiert somit ein außerordentlich wirksames und leicht handhabares Mittel zur Selektion und Aufreinigung der die Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen (TAIZ). Mit Hilfe des Antikörpers lässt sich erfindungsgemäß eine homogene und hochwirksame TAIZ-Population generieren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung selektiert man im Anschluß an die Stufen c) oder d) des oben erwähnten Verfahrens die Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen durch Bindung an den von der Hybridomzelllinie DSM ACC2542 produzierten Antikörper GM-7.

Zur Selektion der erfindungsgemäßen TAIZ wird der Antikörper mit der Probe unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die eine Bindung des Antikörpers an die in der Probe befindlichen Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen erlauben. Die aus der Bindung resultierenden Reaktionskomplexe werden anschließend von der Probe separiert. Zu diesem Zweck kann der Antikörper vor dem Kontakt mit der Probe auf einem Trägermaterial immobilisiert werden; er kann beispielsweise an eine für chromatographische Zwecke verwendbare Matrix oder an sog. "magnetic beads" gebunden werden. Dieses Vorgehen ermöglicht, Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen aus großen Probenvolumina zu selektieren und anzureichern.

Zur Gewinnung der Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen wird nach der Separierung des Reaktionskomplexes von der Probe die Bindung zwischen Antikörper und Transplantatakzeptanz induzierenden Zellen gelöst. Dies kann nach im Stand der Technik bekannten Methoden wie z.B. durch kompetitive Verdrängung oder durch Waschen mit Salzlösungen erfolgen.

Der monoklonale Antikörper GM-7 erlaubt ferner den qualitativen und quantitativen Nachweis der erfindungsgemäßen Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen monozytären Ursprungs in Blut- und/oder Gewebeproben des Patienten *in vitro*. Bei diesem Patienten kann es sich beispielsweise um den Empfänger eines noch zu transplantierenden oder eines bereits transplantierten Organs handeln. Die Bildung von Reaktionskomplexen in der Probe, die das Vorhandensein und gegebenenfalls die Menge der Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen anzeigen, wird mittels bekannter Verfahren nachgewiesen.

Zum Nachweis der Reaktionskomplexe kann vorliegend beispielsweise der Antikörper GM-7 direkt mit einem nachweisbaren Molekül gekoppelt ("markiert") werden, das z.B. kovalent an den Antikörper gebunden wird. Geeignete nachweisbare Moleküle sind auf dem Gebiet der molekularen Diagnostik in großer Anzahl beschrieben und umfassen u.a. Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise Fluorescein-Isothiocyanat oder Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat, Lumineszenzfarbstoffe, radioaktiv markierte Moleküle und Enzyme, wie beispielsweise Peroxidasen (vgl. Lottspeich, F., Zorbas, H. "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 1998).

Der Nachweis des Antikörpers erfolgt in Abhängigkeit des Moleküls, das zu seiner Markierung gewählt wurde. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde der Antikörper GM-7 mit dem fluoreszierenden Molekül Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt, sodaß der Nachweis des Antikörpers mittels Durchflußzytometrie und/oder Fluoreszenzmikroskopie erfolgen konnte. Ver-

fahren zur Markierung von Antikörpern mit FITC sind dem auf dem Gebiet tätigen Fachmann bekannt.

Alternativ kann der Reaktionskomplex auch in einem zweistufigen Verfahren mit Hilfe von sekundären Antikörpern nachgewiesen werden. Dabei kann der unmarkierte Antikörper GM-7 im Reaktionskomplex mit einem weiteren, markierten Antikörper nachgewiesen werden (vgl. Lottspeich, F., Zorbas, H. "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 1998). Dieses zweistufige Nachweisverfahren ist erheblich empfindlicher als der direkte Bindungsnachweis des erfindungsgemäßen Antikörpers, da mehrere markierte sekundäre Antikörper an einen GM-7-Antikörper binden können (Signalverstärkung).

Der Antikörper GM-7 erlaubt demgemäß den Nachweis von TAIZ im peripheren Blut der mit TAIZ behandelten Patienten, beispielsweise in Form eines "monitoring", bei dem in definierten Zeitabständen die Anzahl der Zellen im peripheren Blut bestimmt wird. Es wurde erfindungsgemäß gezeigt, daß die Gegenwart von TAIZ, die aus Monozyten des Spenders hergestellt wurden, im peripheren Blut des Transplantatempfängers im Tierversuch mit Toleranz des transplantierten Organs korreliert. Diese Erkenntnis erlaubt dem Kliniker daher das Ausschleichen, d.h. die stufenweise Reduktion der Dosis gegebenenfalls verabreichter Immunsuppressiva. Bisher war es aus klinischer Sicht nicht möglich, gezielte Aussagen darüber zu treffen, ob das Immunsystem eines Patienten zu einem gegebenen Zeitpunkt nach Transplantation Toleranz aufweist.

Wie für den Fachmann ersichtlich, können auch monoklonale Antikörper gegen TAIZ aus Monozyten nicht-humaner Vertebraten, insbesondere aus erfindungsgemäß modifizierten Monozyten von Primaten und Schweinen, hergestellt werden. Dabei erfolgt die Immunisierung der entsprechenden Wirtstiere und die Generierung der jeweiligen Hybridom-Zelllinien wie oben für die TAIZ humanen Ursprungs beschrieben. Die Generierung von wirkungsvollen TAIZ-

Populationen aus anderen Spezies leistet einen bedeutenden Beitrag auf dem Gebiet der xenologen Transplantionsmedizin.

Die erfindungsgemäßen TAIZ sind per se als pharmazeutisches Präparat einsetzbar. In Kulturmedium (vgl. Beispiel 2) können diese Zellen mindestens 48 Stunden lang gehalten werden, ohne ihre Toleranz induzierende Wirkung zu verlieren.

Für den Einsatz als pharmazeutisches Präparat können die TAIZ suspendiert in humanem AB-Serum (universal verwendbar) intravenös als Kurztransfusion verabreicht werden. Zur Induktion von Transplantat-Akzeptanz bei allogener Transplantation können die aus Monozyten des Spenders generierten TAIZ dem MHC-differenten Empfänger entweder prä-operativ oder post-operativ injiziert werden. Bei prä-operativer Verabreichung sollten die TAIZ etwa 1 Woche vor der Operation ein- oder dreimal injiziert werden. Bei post-operativer Verabreichung sollte der Zeitraum zwischen Operation und der erstmaligen Verabreichung der Zellen nicht länger als 7 Tage betragen. Die erfindungsgemäßen TAIZ sind dann in der Lage, die T-Zell-Antwort des Immunsystems des Empfängers gegen das Transplantat abzuwehren und ausreichend lange im Empfängerblut zu persistieren, um langfristige Transplantat-Akzeptanz zu gewährleisten.

Die prä-operative intravenöse Injektion kommt im Rahmen von Lebendspenden in Betracht; wenn es sich hingegen um eine Leichenspende handelt, so ist die post-operative Verabreichung der erfindungsgemäßen TAIZ angezeigt. Im Falle einer Leichenspende wird der Körper des Spenders durch Kanülierung der Hauptschlagader mit einem Perfusionsmedium zur Organkonservierung durchspült. Hierbei wird das venöse Blut normalerweise über die Hohlevene abgesaugt und verworfen. Zur Gewinnung der erfindungsgemäß einzusetzenden TAIZ kann das venöse Blut gesammelt und wie in Beispiel 1 beschrieben aufgearbeitet werden.

Bei postoperativer Applikation der erfindungsgemäßen TAIZ im Rahmen der Leichenspende kann die Zeit zwischen Transplantation

und Applikation der Zellen durch Kombination mit Immunsuppressiva überbrückt werden, um eine akute Abstoßung des Organs während des Intervalls zwischen Transplantation und Bereitstellung der aus dem Spenderblut gewonnenen TAIZ zu vermeiden. In diesem Zusammenhang kommt die therapeutische Kombination mit herkömmlichen Immunsuppressiva, beispielsweise mit Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A (CSA) oder Tacrolimus oder mit Azathioprin (AZA), Mykophenolatmophetil, Rapamycin, monoklonalen Antikörpern (ATG, ALG, Diclozumab, Basiliximab) oder mit Steroiden (STE) in Betracht. Die Gegenwart der Immunsuppressiva im Empfängerblut übt keinen negativen Einfluß auf die Wirksamkeit der Immunsuppressiva einerseits oder der TAIZ andererseits aus.

In diesem Sinne können die erfindungsgemäß modifizierten Zellen monozytären Ursprungs als "Vehikel zum Toleranztransfer" für jedes zelluläre Transplantat (wie beispielsweise Inselzellen, Hepatozyten, adulte Stammzellen und für jeden anderen programmierten Zelltyp bzw. Gewebetyp) und Organ (wie beispielsweise Niere, Leber, Herz) eingesetzt werden, soweit sie mit den zu transplantierenden Zellen (Organen) genetisch identisch sind, d.h., sie müssen vom Spender selbst oder von dessen identischem Zwilling stammen. Die TAIZ erfüllen ihre protektive Funktion, indem sie das Anwachsen der transplantierten Zellen/-Organe erlauben und damit dem Empfänger die Nebenwirkungen einer längerfristigen immunsuppressiven Therapie ersparen.

Die Erfindung wird nachfolgend im einzelnen erläutert:

Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren sind Blutmonozyten. Vorzugsweise handelt es sich um Monozyten aus menschlichem Blut. Zum Zwecke der Induktion von Transplantat-Akzeptanz müssen die Zellen vom Spender des Transplantats (oder von dessen identischem Zwilling) stammen. Bei xenologer Transplantation von beispielsweise Affen- oder Schweineorganen in Menschen, müssen die erfindungsgemäßen TAIZ demgemäß von Monozyten des jeweiligen Spender-Tieres abgeleitet sein.

Zur Gewinnung der Monozyten kann das Blut zunächst nach üblicher Behandlung mit einem Antikoagulans auf bekannte Weise, vorzugsweise durch Zentrifugation, in Plasma sowie in weiße und rote Blutzellen getrennt werden. Nach der Zentrifugation findet sich das Plasma im Überstand; darunter liegt eine Schicht, welche die Gesamtheit der weißen Blutzellen enthält. Diese Schicht wird auch als "buffy coat" bezeichnet. Darunter befindet sich die rote Blutzellen enthaltende Phase (Hämatokrit).

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zunächst die "buffy coat"-Schicht isoliert und zur Gewinnung der Monozyten beispielsweise durch Zentrifugieren nach bekannten Verfahren aufgetrennt. Gemäß einer bevorzugten Verfahrensvariante wird die "buffy coat"-Schicht auf ein Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll-Hypac) geschichtet und zentrifugiert (vgl. Beispiel 1). Durch weiteres Zentrifugieren und Spülen wird die Fraktion der Monozyten aus dem Blut gewonnen (vgl. Beispiel 1).

Beispiele für alternative Verfahren zur Gewinnung der Monozyten aus dem Vollblut sind das "Fluorescent-Activating Cell Sorting" (FACS), das "Immuno Magnetic Bead Sorting" und "Magnetic Activated Cell Sorting" (MACS), oder das sogenannte "Rosetting-Verfahren", vgl. Gmelig-Meyling F. et al., "Simplified procedure for the separation of human T- und non-T-cells", Vox Sang. 33, 5-8 (1977).

Für die Herstellung einer ausreichenden Menge an TAIZ ist es zunächst erforderlich, die Monozyten zu vermehren. Zu diesem Zweck können bekannte, für Monozyten geeignete Wachstumsmedien verwendet werden, das Medium muß jedoch einen für Monozyten geeigneten Wachstumsfaktor enthalten; erfindungsgemäß ist M-CSF (macrophage-colony-stimulating-factor) besonders bevorzugt. M-CSF (auch als CSF-1 bezeichnet) wird von Monozyten, Fibroblasten und endothelialen Zellen produziert. Die Konzentration von M-CSF in dem Kulturmedium kann von 2 bis 20 µg/l Medium, vorzugsweise 4 bis 6 µg/l und in besonders bevorzugter Weise 5 µg/l betragen.

Anschließend oder gleichzeitig müssen die Zellen mit γ -IFN stimuliert werden, d.h., in Gegenwart von γ -IFN kultiviert werden. Die Stimulierung der Monozyten mit γ -IFN erfolgt nach einer 3 bis 6 Tage langen initialen Vermehrungsphase in dem den Wachstumsfaktor enthaltenden Kulturmedium. Vorzugsweise am 4. Tag nach Beginn der Kultivierung wird mit γ -IFN stimuliert und die Stimulierung erstreckt sich über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden, vorzugsweise 48 Stunden, unter Brutschrankbedingungen, d.h., bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre.

Die Konzentration von γ -IFN in dem Medium kann von 0,1 bis 20 ng/ml, vorzugsweise 1 bis 10 ng/ml und in besonders bevorzugter Weise 5 ng/ml betragen.

Die Stimulierung mit γ -IFN kann gleichzeitig mit der Vermehrung der Monozyten in dem Wachstumsfaktor enthaltenden Medium beginnen. Die Stimulierung im Anschluß an eine 3 bis 6 Tage lange initiale Vermehrungsphase, wie oben angegeben, ist jedoch bevorzugt. Vermehrung der Zellen und Stimulierung mit γ -IFN sollten insgesamt nicht mehr als 8 Tage in Anspruch nehmen. In jedem Falle sollte die Behandlung mit γ -IFN im Anschluß an die Vermehrungsphase über mindestens 24 Stunden, maximal 72 Stunden, vorzugsweise 48 Stunden durchgeführt werden. Der Zeitraum für die Vermehrung und Stimulierung der Zellen sollte demnach insgesamt 4 bis 8 Tage betragen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Vermehrung und die Stimulierung mit γ -Interferon wie in Beispiel 2 angegeben auf solche Weise durchgeführt, daß die Monozyten zunächst in einem den Wachstumsfaktor enthaltenden Kulturmedium vermehrt werden, und dem Kulturmedium nach 3 bis 6 Tagen γ -IFN in einer solchen Menge zugesetzt wird, daß eine Konzentration 0,1 bis 20 ng/ml, vorzugsweise 1 bis 10 ng/ml und in besonders bevorzugter Weise 5 ng/ml in dem Medium erreicht wird.

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren in Kulturgefäßen durchgeführt, deren Oberfläche zuvor mit fötalem Kälberserum (FCS) oder alternativ mit humanem AB-Serum beschichtet wurde (vgl. Beispiel 2). Die Beschichtung mit FCS kann dadurch erfolgen, daß man die Oberfläche der Kulturgefäße vor Ingebrauchnahme mit FCS bedeckt, und nach einer Einwirkungszeit von einigen Stunden, insbesondere 4 bis 72 Stunden, vorzugsweise 12-48 Stunden, und in besonders bevorzugter Weise 24 Stunden, das nicht an der Oberfläche haftende FCS auf geeignete Weise entfernt.

Aufgrund ihrer adhäsiven Eigenschaften haften die Monozyten und die während des Verfahrensablaufs aus diesen hervorgehenden TAIZ am Boden des jeweiligen Kulturgefäßes. Die Ablösung der adhärenten Zellen kann auf mechanische Weise, beispielsweise mit einem feinen Zellschaber oder Spachtel erfolgen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die vollständige Ablösung der Zellen jedoch durch Behandlung mit einem geeigneten Enzym, beispielsweise mit Trypsin (vgl. Beispiel 2). Die Trypsinlösung (0,1 bis 0,025 g/l, vorzugsweise 0,05 g/l, kann 2 bis 10 Minuten lang bei 35°C bis 39°C, vorzugsweise bei 37°C, in Gegenwart von 5% CO₂ auf die Zellen einwirken.

Die Enzymaktivität wird sodann auf übliche Weise blockiert, und die nun frei flottierenden TAIZ können auf übliche Weise durch Zentrifugieren gewonnen werden. Sie stehen nunmehr, entweder suspendiert in einem geeigneten Medium, beispielsweise in PBS, für den sofortigen Einsatz zur Verfügung. Sie können jedoch auch einige Tage lang, insbesondere etwa 2 Tage lang, in einem Nährmedium (vgl. Beispiel 2) gehalten werden, wobei dieses Aufbewahrungsmedium weder den Wachstumsfaktor noch γ-IFN enthalten sollte. In einem derartigen Nährmedium können die Zellen mindestens 48 Stunden lang als TAIZ aufbewahrt werden.

Für die längere Lagerung können die Zellen tiefgefroren werden. Protokolle zum Tiefgefrieren lebender Zellen sind im Stand der Technik bekannt, vgl. Griffith M. et al., Epithelial Cell Culture, Cornea, in methods of tissue engineering, Atala A. und Lanza R.P., Academic Press 2002, Kapitel 4, Seiten 131-140. Ein bevorzugtes Suspensionsmedium zum Tiefgefrieren der erfindungsgemäßen Zellen ist DMSO enthaltendes FCS, vgl. Beispiel 2.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert.

Beispiel 1

Abtrennen von Monozyten aus Gesamtblut

Zur Vermeidung der Blutgerinnung und zum Füttern der Zellen wurden 450 ml humanes Vollblut in einem 3-Kammerbeutel-Set mit 63 ml einer Stabilisator-Lösung vermischt, die je Liter H₂O 3,27 g Citronensäure, 26,3 g Trinatriumcitrat, 25,5 g Dextrose, und 22,22 g Natriumdihydroxyphosphat enthielt. Der pH-Wert der Lösung betrug 5,6-5,8.

Zur Blutkomponententrennung erfolgte anschließend eine »scharfe Zentrifugation« dieses Gemisches zur Blutkomponententrennung, bei 4000 rpm über 7 min bei 20°C. Hieraus resultierte eine 3-Schichtung der korpuskulären und nicht-korpuskulären Bestandteile. Durch Einsetzen des Beutelsets in eine dafür vorgesehene Preßmaschine wurden dann die Erythrozyten in den unteren Beutel, das Plasma in den oberen Beutel gepreßt und der sogenannte Buffy-coat verblieb im mittleren Beutel und enthielt ca. 50 ml Volumen.

Die Menge von 50 ml frisch gewonnenem Buffy-coat wurde nun in jeweils 2 Portionen á 25 ml geteilt und damit jeweils 25 ml Ficoll-Hypaque Separationsmedium überschichtet, welches zuvor in zwei 50 ml Falconröhren gefüllt worden war.

Dieser Ansatz wurde 30 Min. lang bei 2500 rpm ungebremst zentrifugiert. Im Buffy coat noch vorhandene Erythrozyten und tote Zellen lagen danach unterhalb der Ficoll-Phase, während die weißen Blutzellen einschließlich der Monozyten als weiße Interphase auf dem Ficoll separiert sind.

Anschließend wurde die weiße Interphase der Monozyten vorsichtig abpipettiert und mit 10 ml Phosphat gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gemischt.

Danach wurde dieser Ansatz dreimal 10 Min. lang bei 1800 rpm gebremst zentrifugiert, wobei der Überstand nach jeder Zentrifugation abpipettiert und mit frischem PBS aufgefüllt wurde.

Das am Boden des Zentrifugationsgefäßes (Falconröhrenchen) gesammelte Zellpellet enthielt die mononukleäre Zellfraktion, d.h. die Monozyten.

Zur Herstellung der für die Rattenexperimente benötigten Monozyten, wurden jeweils aus 4 genetisch-identen Spenderratten 25 ml Vollblut isoliert und damit 25 ml Ficoll-Hypaque Separationsmedium überschichtet. Es wurde dann analog wie oben beschrieben fortgefahrene.

Beispiel 2 Vermehrung und Modifikation der Monozyten

Die Kultivierung und Vermehrung der Monozyten erfolgte in Nährmedium der folgenden Zusammensetzung:

RPMI 1640 Medium	440 ml
Foetales Kälberserum (FCS), alternativ AB-Serum	50 ml
Penicillin / Streptomycin Lösung	5 ml
Gesamtvolumen	500 ml
Das Nährmedium enthielt 2,5 µg / 500 ml M-CSF	

Die in Beispiel 1 isolierten Monozyten wurden in einer Menge von insgesamt 10^6 Zellen in 10 ml des Nährmediums suspendiert und auf eine Petrischale (100 mm Durchmesser) übertragen. Die Petrischale war zuvor mit reinem inaktivierten FCS gefüllt und das FCS nach 24 Stunden abgegossen worden, um auf diese Weise eine FCS beschichtete Platte zu erhalten.

Die Petrischale wurde mit dem zugehörigen Deckel abgedeckt und 3 Tage lang in einem Brutschrank bei 37°C gehalten. Die Zellen setzten sich nach 24 Stunden am Boden der Petrischale ab. Am zweiten Tag wurde der Überstand abpipettiert und die Petrischale mit 10 ml frischem Nährmedium wieder aufgefüllt.

Am 4. Tag wurden 50 ng γ -Interferon in 10 ml Nährmedium zugesetzt und die Platte wurde wiederum verschlossen und weitere 48 Stunden lang bei 37°C im Brutschrank gehalten.

Nachfolgend wurden jeweils 10 ml einer 1:10 mit PBS verdünnten Trypsinlösung in die Petrischale pipettiert. Die geschlossene Petrischale wurde 10 Min. lang bei 37°C im Brutschrank gehalten. Anschließend erfolgte die Separation der auf dem Boden der Petrischale haftenden Zellen mit einem Zellschaber, derart, dass der größte Anteil (>90%) der Zellen im Überstand flottierten.

Der gesamte Überstand (10 ml Trypsinlösung + 10 ml Medium) wurde abpipettiert, in einem 50 ml Falconröhrchen vereinigt und 10 Min. lang bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend verworfen und der Niederschlag (das verbliebene Zellpellet) mit frischem Nährmedium (s.o.) versetzt, wobei pro 10^6 Zellen 1 ml des Nährmediums zugesetzt wurden. Die Bestimmung der Zellzahl für die exakte Dosierung erfolgte nach bekannten Verfahren, vergl. Hay R.J., Cell Quantification and Characterisation, in Methods of Tissue Engineering, Academic Press 2002, Kapitel 4, S. 55-84.

Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (1800 rpm, 10 min, s.o.) und das Zellpellet wurde entweder in PBS oder zur Anwendung beim Menschen in NaCl (physiol.) aufgenommen. Danach kann die intravenöse Applikation direkt oder innerhalb von 48 Stunden erfolgen.

Alternativ wurden die Zellen nach Zentrifugation und Verwerfen des Trypsin enthaltenden Überstandes mit FCS/DMSO als Einfriermedium versetzt und in einem Volumen von 10 ml tiefgefroren.

Das Einfriermedium enthielt 95% FCS und 5% DMSO. Jeweils etwa 10^6 Zellen wurden in 1 ml des Mediums aufgenommen und in folgenden Stufen abgekühlt:

- 30 Min. auf Eis;
- 2 Stunden bei -20°C im vorgekühlten Styroporkasten;
- 24 Stunden bei -80°C in Styropor;
- Lagerung in Röhrchen in Flüssigstickstoff (N_2) bei -180°C .

Figur 1 belegt die mittels Durchflußzytometrie bestimmten phe-notypischen Veränderungen der Antigenexpression auf den eingesetzten Monozyten nach Kultivierung und γ -IFN-Stimulation der monozytären Ursprungszellen.

Beispiel 3

Anwendung der Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen (TAIZ) zur Präkonditionierung des Immunsystems des Transplantat-Empfängers

Die Anwendung von TAIZ zur Behandlung eines potentiellen Empfängers vor der Transplantation bietet sich zum Beispiel für den klinischen Fall der Lebendspende an, wo bereits im Vorfeld einer Organtransplantation geklärt ist, wer spendet und wer das Spenderorgan erhält.

Für diesen Fall wurde im Rattenmodell die heterotope Herztransplantation an männlichen Inzuchtratten der Stammkombination LEW[RT1.¹] (im Rahmen der vorliegenden Erfindung als "LEW" bezeichnet) -> DA[RT1.^{av1}] (im Rahmen der vorliegenden Erfindung als "DA" bezeichnet) in der von Ono und Lindsey beschriebenen Technik (Ref. Ono, K. & Lindsey, E.S. Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 57, 225-229 (1969)) durchgeführt. DA Empfängerratten erhielten zunächst am Tag -7 vor der Transplantation 10^6 von LEW-Monozyten abgeleitete TAIZ in 1 ml PBS intravenös verabreicht. Hiernach erfolgte sieben Tage später die Transplantation eines vom LEW-Rattenstamm entnommenen Herzens, welches heterotop in das Abdomen (Leibeshöhle) des DA-Empfängertieres eingepflanzt wurde. Da es sich bei den verwendeten Rattenstämmen um Inzuchtstämme handelt, exprimierten die erfindungsgemäßen TAIZ die identischen Gewebeantigene wie das transplantierte LEW-Herz.

Zur Kontrolle erfolgte eine sogenannte Drittstammtransplantation. Hierbei wurden wiederum am Tag -7 (d.h. 7 Tage vor dem operativen Eingriff) vom gleichen LEW-Spendertier stammende TAIZ (10^6) intravenös in DA Tiere injiziert. Sieben Tage danach erfolgte die Transplantation eines von einem CAP[RT1.^c] (im Rahmen der vorliegenden Erfindung als "CAP" bezeichnet) Ratteinzuchtstamm entnommenen Herzens. CAP-Ratten exprimieren den Haplotyp RT1.^c, sind damit also voll MHC-diskordant (MHC-verschieden) mit den LEW-Spendertieren. Nachfolgend sind die einzelnen Versuchsgruppen, in denen eine heterotope Herztransplantation erfolgte (n=10) dargestellt:

1. LEW -> DA; unbehandelt;
2. LEW -> DA; 10^6 LEW-abgeleitete TAIZ i.v., Tag -7 vor LEW-Herztransplantation;
3. CAP -> DA; 10^6 LEW-abgeleitete TAIZ i.v., Tag -7 vor LEW-Herztransplantation;
4. CAP -> DA; unbehandelt;
5. LEW -> LEW, unbehandelt;

6. LEW -> LEW, 10^6 LEW-abgeleitete TAIZ i.v., Tag -7, vor LEW-Herztransplantat.

Wie aus den Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Herzorgane erkennbar (Figur 2A), wurden 9/10 LEW-Herzen von DA-Empfängertieren langzeit (>150 Tage) akzeptiert, wogegen CAP-Drittstammherzen akut, nach $6,7 \pm 0,8$ Tagen abgestoßen wurden. Erfolgte keine vorherige Gabe von TAIZ, so wurden auch die LEW-Herzen akut nach $7,2 \pm 1,0$ Tagen abgestoßen. Die Abstoßung von CAP Herzen durch die im DA-Tier stimulierte Immunantwort nach $6,7 \pm 0,8$ Tagen erfolgte im gleichen Zeitintervall wie in der unbehandelten Kontrollgruppe, in der CAP-Herzen von DA-Ratten nach $6,9 \pm 1,0$ Tagen abgestoßen wurden siehe Gruppe 3, respektive Gruppe 4. Alle syngen im LEW -> LEW-Ansatz transplantierten Herzen überlebten langzeit (>150 Tage), unabhängig davon, ob TAIZ-Vorbehandlungen erfolgt waren oder nicht. Hieraus lässt sich der Schluß ziehen, dass TAIZ den Empfängerorganismus nicht im Sinne einer graft-versus-host disease (Transplantat gegen Wirt Erkrankung) gefährden. Ferner lässt sich aus diesem Ergebnis ableiten, dass die i.v.-Gabe von 10^6 TAIZ 1 Woche vor Transplantation, die Möglichkeit zur Induktion von Langzeit-Organakzeptanz eröffnet. Die induzierte Toleranz ist dabei spender-spezifisch, da eine entsprechende Vorbehandlung von DA Ratten mit LEW-abgeleiteten TAIZ keine Toleranz für CAP-Drittstamm-Herztransplantate induziert. Im syngenen LEW > LEW-Ansatz beeinflusst die zusätzliche TAIZ-Gabe weder das Überleben der Empfängertiere noch der Transplantate.

Figur 2B zeigt die histologische Beurteilung eines LEW-Allo-transplantats am 150. postoperativen Tag (POT) nach heterotoper Transplantation in das Abdomen einer DA-Empfängerratte. Die Empfängerratte war am Tag -7 vor der Transplantation mit 10^6 LEW-abgeleiteten TAIZ vorbehandelt worden. Das Transplantat wies bis zum Zeitpunkt seiner Entnahme aus der Empfängerratte (150. POT) eine gute Funktion (kräftiger Herzschlag) auf. Das histologische Präparat (x40) zeigt eine intakte Herzmuskelmorphologie, normale Gefäßendothelien und nur minimale Infiltrate.

tion mit mononukleären Zellen ohne Hinweise für akute und chronische Abstoßungsvorgänge.

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache, daß sich spenderabgeleitete Zellen (detektiert durch immunhistochemischen Nachweis mittels dem LEW-MHC-Klasse I-spezifischen Antikörper II.69) langzeit, über ein Jahr, im Thymus der DA-Empfängerratten nachweisen lassen. Figur 2C zeigt ein histologisches Präparat eines am 150. POT entnommenen Thymus einer mit 10^6 LEW-abgeleiteten TAIZ vorbehandelten DA-Ratte. Das Präparat wurde mit dem für LEW-MHC-Klasse I spezifischen monoklonalen Antikörper I 1.69 markiert. Wie der Figur zu entnehmen ist, führt die Gabe von TAIZ zur Besiedlung der Thymusdrüse, wo die Präsentation von Spender-abgeleiteten MHC-Antigenen an die heranreifenden T-Zellen erfolgt; deutlich zu erkennen sind kleine Nester von Zellen, die sich mit dem Antikörper markieren lassen.

Beispiel 4

Nachweis von Spender-abgeleiteten modifizierten Monozyten im Empfänger

Als mögliche Ursache der erfindungsgemäß induzierten Toleranz kommt die Induktion eines gemischten Chimerismus in dem jeweiligen DA-Tier durch die intravenöse Injektion der LEW-abgeleiteten TAIZ in Betracht. Es wurde daher geprüft, ob sich nach Injektion von LEW-abgeleiteten TAIZ mittels Durchflußzytometrie langfristig (>45 Tage) mehr als 5% Zellen im Blut des Empfängertiers nachweisen lassen. Die Durchflußzytometrie wurde wie im Stand der Technik beschrieben durchgeführt (Ref. Preffer FI, Flow cytometry In: *Diagnostic Immunopathology*, Colvin RB, Bhan AK, McCluskey, RT (eds.), Raven Press New York, pp. 725-449 (1994)). Der Nachweis der LEW-Spenderzellen im DA-Empfängerblut erfolgte durch den monoklonalen Antikörper II.69, der LEW-MHC-Klasse I Antigene spezifisch detektiert (siehe Fändrich F, et

al. *Nature Med.* 8, 171-178, 2002). Die Chimerismusdaten, welche für 4 in Beispiel 3 beschriebenen LEW -> DA Transplantationen nach Gabe von 10^6 , respektive 10^4 TAIZ / kg x KG im peripheren Blut der Empfängertiere bestimmt wurden, sind in Figur 2D wiedergegeben.

Nach Injektion von LEW-abgeleiteten TAIZ in vier nicht immun-supprimierte DA Empfängerratten (10^6 Zellen / kg x KG in Ratten 1-3 und 10^4 Zellen / kg x KG in Ratte 4) zeigen die Ratten 1-3 einen längerfristigen Chimerismus (60-80 Tage) im DA-Empfängerblut, der sich auf Spender-abgeleitete Zellen zurückführen ließ. Der Nachweis von Spender-abgeleiteten Zellen erfolgte durch durchflußzytometrische Bestimmung unter Verwendung des LEW-MHC-Klasse I spezifischen Antikörper II.69 (ein monoklonaler Antikörper, der nur an MHC-Klasse I positive Zellen vom LEW-Rattenstamm bindet und nicht mit Zellen vom DA-Rattenstamm kreuzreagiert. Da quasi alle Zellen des peripheren Bluts MHC-Klasse I Antigen auf der Zelloberfläche exprimieren, lässt sich der Anteil an Spenderzellen im peripheren Blut der DA Ratte mit II.69 sehr genau bestimmen. Wie die Graphik zeigt, exprimieren 3 von 4 Tieren innerhalb der ersten 6 Wochen nach intravenöser Injektion der TAIZ mehr als 10% der Zellen das durch II.69 markierte Spenderantigen. Ab Tag 60 nach Injektion fällt dieser Chimerismusanteil im peripheren Blut dieser DA-Ratten deutlich ab und verschwindet mit Tag 100 komplett. Dieser transiente Chimerismus korreliert aber streng mit dem Transplantatüberleben zweizeitig (d.h. 7 Tage nach TAIZ-Injektion) transplanterter LEW-Herzen, die trotz fehlendem Spenderchimerismus (ab Tag 100) nicht mehr abgestoßen werden (im Beispiel Ratte 1-3). Hingegen kann die kurzfristige Chimerismusinduktion nach Gabe von 10^4 Zellen / kg x KG (Ratte 4; <20 Tage) keine langfristige Transplantatakzeptanz des übertragenen Herzens gewährleisten.

Beispiel 5

Gabe von Spender-abgeleiteten Zellen post transplantationem

Für den klinischen Fall der Leichenspende sollte nun evaluiert werden, inwieweit die postoperative Gabe von TAIZ in der Lage war, entsprechende Langzeitakzeptanz für das transplantierte Organ im Empfänger zu induzieren. Hierzu wurden im LEW -> DA Ratteninzuchtstammmodell heterotope Herztransplantationen durchgeführt. Die DA Empfängerratten erhielten 4 Zyklen Cyclosporin A (CSA) an den Tagen 0, 1, 2 und 3 nach der Transplantation, intravenös, in der Dosierung 5 mg CSA / kg x KG. Am Tag 7 erfolgte dann die intravenöse Gabe von 10^6 LEW-abgeleiteten TAIZ, intravenös, in die Schwanzvene der DA-Empfängerratten. Als Kontrolle dienten folgende Versuchsgruppen (n=6-10).

1. LEW -> DA; unbehandelt
2. LEW -> DA; CSA, 5 mg / kg x KG, i.v., Tag 0, 1, 2 und 3
3. LEW -> DA; CSA, 5 mg / kg x KG, i.v., Tag 0, 1, 2 und 3 plus 10^6 LEW-abgeleitete TAIZ, i.v., Tag 7
4. LEW -> DA; 10^6 LEW-abgeleitete TAIZ, i.v., Tag 7
5. CAP -> DA; CSA, 5 mg / kg x KG, i.v., Tag 0, 1, 2 und 3 plus 10^6 LEW-abgeleitete TAIZ, i.v., Tag 7

Die postoperative Behandlung der DA-Empfängerratten mit 10^6 LEW-abgeleiteten TAIZ, intravenös, am 7. POT führt zur Langzeittoleranz, wenn eine initiale Gabe von 4 Zyklen CSA (5mg/kg x KG, i.v.) von Tag 0-3 erfolgt ist. Die initiale Gabe von CSA ist notwendig, da die alleinige Behandlung mit einer einmaligen Gabe von 10^6 TAIZ am 7. POT (postoperativen Tag) die akute Abstoßung nur in 1/6 Fällen verhinderte. Die gewählte CSA-Dosis wirkt hierbei nur subtherapeutisch, da zwar das Transplantatüberleben verlängert wird, aber keine Langzeitakzeptanz durch alleinige CSA-Gabe induziert werden kann. Die induzierte Transplantatakzeptanz ist spenderspezifisch, da eine entsprechende Behandlung von DA Ratten mit LEW-abgeleiteten TAIZ keine Toleranz für CAP-Drittstamm-Herztransplantate induziert.

Wie in Figur 3 ersichtlich wurden Herzen der Versuchsgruppe 1 akut nach $7,0 \pm 0,8$ Tagen abgestoßen. Herzen der Gruppe 2 wurden verzögert nach $14,4 \pm 7,0$ Tagen abgestoßen. Herzen der Gruppe 3 wurden in 5/6 Fällen länger als 150 Tage akzeptiert. Im Rattensystem gilt die Akzeptanz von Organen für mehr als 100 Tage bereits als Langzeitakzeptanz, da die mittlere Lebenserwartung einer Inuchtratte nur ca. 2 Jahre beträgt. Die alleinige postoperative Gabe von TAIZ (10^6 Zellen) konnte die akute Abstoßung nur in 1/6 Fällen verhindern, da die Herzorgane nach $22,6 \pm 31,6$ Tagen zu schlagen aufhörten (Gruppe 4). Die Drittstammkontrolle mit CAP-Herzen zeigte die Spezifität der induzierten Transplantatakzeptanz, da Drittstammherzen wiederum akut nach $7,4 \pm 2,2$ Tagen abgestoßen wurden. Diese Ergebnisse belegen auch, dass die zusätzliche Anwendung von TAIZ keine generelle Immunsuppression erzeugt, da die akute Abstoßung der CAP-Herzen nicht verhinderte.

Beispiel 6

Untersuchungen zur Organspezifität der durch TAIZ induzierten Langzeitakzeptanz

Um auszuschließen, dass TAIZ lediglich für Herztransplantate einen protektiven Schutz gegen die allospezifische, vom Empfänger gegen die Spenderantigene gerichtete Immunantwort vermitteln kann, wurden im stark abstoßenden DA \rightarrow LEW Ratteninzuchtsystem folgende Organe in folgenden Versuchsgruppen (n=6) transplantiert:

1. DA (Niere) \rightarrow LEW; unbehandelt
2. DA (Niere) \rightarrow LEW; 10^6 DA-abgeleitete TAIZ, i.v., Tag -7 und -1 vor Transplantation
3. LEW (Niere) \rightarrow LEW; unbehandelt
4. DA (Leber) \rightarrow LEW; unbehandelt
5. DA (Leber) \rightarrow LEW; 10^6 DA-abgeleitete TAIZ, i.v., Tag -7 und -1 vor Transplantation
6. LEW (Leber) \rightarrow LEW; unbehandelt

7. DA (Haut) -> LEW; unbehandelt
8. DA (Haut) -> LEW; 10^6 DA-abgeleitete TAIZ, i.v., Tag -7 und -1 Transplantation
9. LEW (Haut) -> LEW; unbehandelt

Wie aus den in Figur 4A-C dargestellten Kaplan-Meier-Plots ersichtlich wurden 6/6 Nierenorgane, 5/6 Leberorgane und 5/6 Hauttransplantate langfristig (>150) Tage von LEW-Empfängerratten akzeptiert. Alle syngenen Organtransplantationen dienten zur Kontrolle der technisch komplikationslosen Durchführung und wurden uneingeschränkt vom Empfängertier angenommen (nicht in den Überlebenskurven gezeigt). Es zeigt sich demnach auch in diesen Versuchsansätzen, daß die intravenöse Vorabinjektion von 10×10^6 TAIZ Langzeitorganakzeptanz für mehr als 80% der transplantierten Organe induziert.

Die o.a. Nieren-, Leber-, und Hauttransplantate, die mit und ohne vorheriger Gabe von TAIZ transplantiert worden waren, wurden im folgenden histologisch untersucht. In Figur 4D erkennt man, daß durch die zweimalige intavenöse Injektion von 10^6 TAIZ pro kg Körpermassen an den Tagen -7 und -1 vor Transplantation, die Morphologie der Transplantatniere als intakt (vgl. Kontrollniere und sygenes Transplantat LEW -> LEW) zur Darstellung kommt, wogegen in der nicht-behandelten allogenen Kontrollgruppe DA -> LEW eine deutliche Infiltration des Transplantates im Interstitium zu erkennen ist (postoperativer Tag 14). Analog dazu verhält sich das allogene Lebertransplantat (Figur 4E), welches ohne TAIZ-Vorbehandlung am 12. POT komplett abgestoßen ist (DA -> LEW ohne TAIZ), wogegen die Vorabgabe von TAIZ das Parenchym der Lebertransplantate im Vergleich zum syngenen Transplantat völlig homogen und intakt erscheinen läßt. Auch das allogene Hauttransplantat (DA) heilt komplikationslos ein (s. Vergleich zum syngenen LEW-Transplantat) wogegen das simultan mit-transplantierte CAP-Drittstammtransplantat am 12. Postoperativen Tag bereits akut abgestoßen wurde. Dieses Beispiel beweist die Spezifität der durch TAIZ induzierten Toleranz, da die Vorbehandlung des LEW-Empfängertieres mit

DA-abgeleiteten TAIZ an den Tagen -7 und -1 zur Akzeptanz des DA-Transplantates führt, wogegen das am Tag 0 simultan mittransplantierte CAP-Hauttransplantat akut abgestoßen wird (Figur 4F).

Beispiel 7A

Untersuchungen zur Haplotypspezifität der durch TAIZ induzierten Langzeitorganakzeptanz

Um auszuschließen, dass TAIZ lediglich in der gewählten Ratteninzuchtstamm-Kombination LEW -> DA Langzeitorganakzeptanz induziert, wurden folgende weitere Inzuchtstammkombinationen im heterotopen Herztransplantationsmodell überprüft (n=6). Dabei wurde u.a. auch der Inzuchtstamm BN[RT1.^a] (im Rahmen der vorliegenden Erfindung als "BN" bezeichnet) verwendet.

1. DA -> LEW; unbehandelt
2. DA -> LEW; CSA, 5 mg / kg x KG, i.v., Tag 0, 1, 2, 3 plus 10^6 DA-abgeleitete TAIZ / kg x KG, i.v., Tag 7 und 10 postoperativ
3. CAP -> LEW; unbehandelt
4. CAP -> LEW; CSA, 5 mg / kg x KG, i.v., Tag 0, 1, 2, 3 plus 10^6 CAP-abgeleitete TAIZ / kg x KG, i.v., Tag 7 und 10
5. BN -> LEW; unbehandelt
6. BN -> LEW; CSA, 5 mg / kg x KG, i.v., Tag 0, 1, 2, 3 plus 10^6 BN-abgeleitete TAIZ / kg x KG, i.v., Tag 7 und 10

Aus Vorversuchen war bereits bekannt, dass in der sogenannten "high-responder"-Kombination (DA -> LEW), die mit der stärksten im Ratteninzuchtmödell bekannten Abstoßungsreaktion einhergeht, die einmalige postoperative i.v.-Gabe von 10^6 TAIZ keine Langzeitakzeptanz erzielen kann. Es wurde daher mit einer zweimaligen Gabe versucht, die Präsenz von TAIZ im Empfängertier zu erhöhen. Wie aus den zugehörigen in Figur 5A dargestellten Überlebenskurven hervorgeht, erreichte die zweimalige Gabe von TAIZ, an den postoperativen Tagen 7 und 10 verabreicht, eine

Langzeitorganakzeptanz in 4/6 Fällen in Gruppe 2 und in 5/6 Fällen in den Versuchsgruppen 4. In der BN -> LEW-Stammkombination überlebten alle transplantierten Organe langzeit ohne Hinweise für eine akute Abstoßung. In allen Fällen, in denen die transplantierten Herzen langzeit (>150 Tage) akzeptiert worden waren, konnte in den Empfängertieren ein gemischter Chimerismus während der ersten 20-45 Tage nach TAIZ-Gabe nachgewiesen werden. Ein frühzeitiges Organversagen dagegen ging immer mit fehlenden Spenderzellen im peripheren Blut des Empfängers einher. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die i.v.-Gabe von TAIZ nur dann zur Langzeitorganakzeptanz führt, wenn die Zellen einen gemischten Spenderchimerismus induzieren, der zumindest für 21 Tage nachweisbar ist. Damit werden auch die Figur 2D gezeigten Versuchsergebnisse bestätigt.

Durch die postoperative Gabe von 10^6 pro kg Körpergewicht, die jeweils an den Tagen 7 und 10 intravenös den Empfängertieren verabreicht wurden, konnte demnach in allen 3 Inzuchtstammkombinationen in über 80% Langzeittoleranz induziert werden, wenn zusätzlich initial 4 Zyklen CSA verabreicht wurden.

Beispiel 7B

Untersuchungen zur Bedeutung der γ -IFN Stimulation M-CSF-behandelter Monozyten zur in vivo Toleranzinduktion

Um die Effizienz der zusätzlichen Stimulation M-CSF-behandelter Blutmonozyten mit γ -Interferon auf die Toleranzentstehung in vivo näher charakterisieren zu können, wurden im LEW -> DA Ratteninzuchtmodell für die heterotope Herztransplantation folgende Versuchsgruppen untersucht (n = 6 Tiere pro Gruppe):

1. LEW -> DA, 10^6 / kg x KG LEW-abgeleitete Blutmonozyten (unkultivierte Monozyten), i.v., Tag -7 vor Herztransplantation

2. LEW -> DA, 10^6 / kg x KG LEW-abgeleitete Blutmonozyten (M-CSF behandelt), i.v., Tag -7 vor Herztransplantation
3. LEW -> DA, 10^6 / kg x KG LEW-abgeleitete Blutmonozyten (γ -IFN stimuliert), i.v., Tag -7 vor Herztransplantation
4. LEW -> DA, 10^6 / kg x KG LEW-abgeleitete Blutmonozyten (M-CSF behandelt plus γ -IFN stimuliert), i.v., Tag -7 vor Herztransplantation

Wie aus den Kaplan-Meier Überlebenskurven der Figur 5B hervorgeht, konnte die intravenöse Gabe von frischen, nicht-kultivierten LEW-abgeleiteten Blutmonozyten, 7 Tage vor Herztransplantation, die akute Allotransplantatabstoßung der LEW-Herzen im DA-Empfängertier nicht verhindern. Die Transplantate dieser Versuchsgruppe wurden im Mittel (\pm SD) nach $7,8 \pm 0,8$ Tagen abgestoßen. Hingegen führte die Vorabgabe von Monozyten, die über 6 Tage mit M-CSF kultiviert worden waren, zur signifikanten Organüberlebenszeitverlängerung, da in dieser Versuchsgruppe eine Abstoßung im Mittel erst nach $35,0 \pm 51,5$ Tagen zu beobachten war. Die alleinige Stimulation frischer Blutmonozyten mit γ -IFN über 48 Stunden in RPMI-Medium, welches kein M-CSF erhielt, konnte die akute Abstoßung der Herztransplantate, die im Mittel nach $7,8 \pm 1,2$ Tagen zu schlagen aufhörten, nicht verhindern. Allein die M-CSF-Behandlung frischer Blutmonozyten über 6 Tage und die zusätzliche Stimulation dieser Zellen mit γ -IFN über 48 Std. (an Tag 5 und 6) führte zur Langzeitorgan-toleranz (> 150 Tagen) in 4 von 6 Transplantaten. Die Ergebnisse zeigen die entscheidende Bedeutung der zusätzlichen Stimulation der M-CSF-behandelten Monozyten mit γ -IFN für die Entstehung einer *in vivo* Toleranz.

Beispiel 8

Untersuchungen zur Speziesspezifität der durch TAIZ induzierten Langzeitorganakzeptanz

Um auszuschließen, dass TAIZ lediglich in der gewählten Tierspezies Ratte wirksam eine Langzeitorganakzeptanz induzierte,

wurden analog der in Beispiel 2 angegebenen Methodik Zellen monozytären Ursprungs aus dem Spenderschwein isoliert, wobei die Stimulation mit γ -IFN durch Zugabe von 1000 U/10 ml Nährmedium für 24 Std. erfolgte. Anschließend erfolgte die Prüfung auf Effektivität von TAIZ zur Unterdrückung der akuten Abstoßung im Modell der linksseitigen Lungentransplantation an "outbred minipigs", die eine dem Menschen vergleichbare Potenz zum Abstoßen ihrer Organe aufweisen. Hierbei wird der linksseitige Lungenflügel eines Spenderschweins entnommen und in ein genetisch differentes Empfängerschwein orthotop transplantiert (also in die linke Brusthöhle, nachdem dem Empfängerschwein zuvor die linke Lunge entfernt worden war). Zum Zeitpunkt der Lungenentnahme erfolgte simultan die Entnahme von 500 ml Spenderblut, das zur Aufbereitung der TAIZ aus Monozyten dieses Schweines diente.

Die Empfängertiere wiesen alle ein Gewicht von 30-35 kg auf. Folgende Versuchsguppen wurden im Schwein (n=4) etabliert:

1. CSA, 5 g / Tag, 50 mg Azathioprin / Tag, 25 mg Methylprednisolon / Tag, für insgesamt 28 Tage
2. wie Gruppe 1, plus 10^8 Knochenmarkzellen (KM) des Spenderschweins / kg x KG Empfängerschwein plus 4,5 Gy Ganzkörperbestrahlung (GKB) des Empfängerschweins
3. wie Gruppe 1, plus 10^6 vom Spenderschwein abgeleitete TAIZ / kg x KG an den postoperativen Tagen 7 und 10 nach Lungentransplantation

Wie in Figur 6A ersichtlich erfolgte die Abstoßung der Lungentransplantation in Gruppe 1 durchschnittlich nach $50,3 \pm 9,9$ Tage nach Absetzen der Immunsuppression. Dagegen stießen Tiere der Gruppe 2 ihre Organe nach $102,3 \pm 81,0$ Tagen ab. Triple-Immunsuppression in Verbindung mit zweimaliger TAIZ-Behandlung verlängerte das Organüberleben auf $292 \pm 135,5$ Tage, wobei 3/4 Tiere Langzeitorganakzeptanz (>350 Tage) ihrer Organe zeigten. In allen Fällen der Gruppe 3 war ein gemischter Spenderchime-

rismus im Empfängerblut von >21 Tagen zu beobachten, wogegen Tiere der Gruppe 1 und 2 nur kurzfristigen gemischten Chimerismus für 6-8 Tage zeigten. Figur 6B zeigt die Lungentransplantate eines Schweins der Versuchsgruppe 1 (POT 41) und eines mit TAIZ behandelten Schweins der Versuchsgruppe 3 (55 Tage nach Transplantation; B). Während in Projektion auf die linksseitige Thoraxwand um die Herzsillhouette eine sichtbare Transparenzminderung (Verschattung) als Ausdruck des abgestoßenen Lungentransplantation bei dem Schwein der Versuchsgruppe 1 zu erkennen ist, zeigt die Röntgenthoraxaufnahme des mit TAIZ behandelten Tieres einen röntgenologisch unauffälligen Lungen-, respektive Transplantatbefund mit guter Abgrenzbarkeit zur Herzsillhouette.

Beispiel 9

In vitro Untersuchungen zur Wirksamkeit humaner TAIZ in der gemischten Lymphozytenkultur

Zur Untersuchung der immunsuppressiven Wirkung der TAIZ erfolgte eine gemischte zweiseitige Lymphozytenkultur (MLC = mixed lymphocyte culture), wobei die eingesetzten humanen TAIZ wie in Beispiel 2 beschrieben generiert wurden. Die MLC wurde wie bei James T. Kurnick, Cellular assays, In: *Diagnostic Immunopathology*, Colvin RB, Bhan AK, McCluskey, RT (eds.), Raven Press, New York, pp 751-771 (1994) beschrieben, durchgeführt.

Figur 7A zeigt, dass 10^5 von einem Individuum B abgeleitete TAIZ in der Lage sind, die Proliferationsaktivität von T-Zellen (gemessen als Einbau [3 H]-radioaktiv-markierten Thymidins in counts per minute, cpm) eines Individuums A nach deren Stimulation mit bestrahlten Lymphoblasten von einem Spender C (alle 3 Individuen waren entsprechend der HLA-Typisierung vollständig MHC-diskordant untereinander) von 39.200 (Medium ohne Zellen; weiße Säule) auf 5.400 cpm (TAIZ B 50.000) zu supprimieren. Normale, unbehandelte Monozyten von Individuum B, die nicht in M-CSF kultiviert und nicht mit γ -IFN stimuliert wurden, supprimieren

dagegen die Proliferation der von einem Individuum A isolierten T-Zellen nur auf 19.500 cpm (MO B 50.000). Ferner ist der Suppressionseffekt der TAIZ dosisabhängig, da die Inhibition der T-Zell-proliferation von der Menge der eingesetzten TAIZ abhängt. Im Beispiel war die eingesetzte Menge von 10.000 TAIZ nicht in der Lage, die Proliferation gegenüber nicht-TAIZ-behandelten T-Zellen signifikant zu reduzieren, 29.800 cpm (TAIZ B 10.000) versus 31.900 cpm (MO B 10.000).

Zur Klärung, warum im Tierversuch ein Teil der Zellen abgestoßen wird und kein transienter Chimerismus (>21 Tage) entsteht, wurde die nach 6 tägiger Zellkultivierung (mit M-CSF und γ -IFN stimulierte Zellen) in der Durchflußzytometrie untersucht. Es zeigt sich hierbei eine Zellpopulation großer monozytärer Zellen und eine Entität lymphozytärer Zellen. Die monozytären Zellen exprimieren zum größten Teil (>95%) das typische monozyten-spezifische Antigen CD14, wogegen sich die lymphozytären Zellen weitestgehend aus B-Zellen ($CD20^+$) rekrutieren. Die Trennung beider Zellpopulationen erfolgte in einem nächsten Schritt mit Anti-CD14-, respektive Anti-CD20-Antikörpern gekoppelten magnetic beads, um dann den Einfluß der jeweiligen Zellentität auf die T-Zellproliferation in der MLC getrennt zu untersuchen. Wie in Figur 7B gezeigt, konnte die lymphozytäre Zellpopulation eines Spenders B, die nach 6 tägiger Kultivierung mit M-CSF und anschließender 2-tägiger Stimulation mit γ -IFN als nicht adhäsente Zellfraktion noch persistiert, die T-Zellpopulation eines nicht-verwandten Responders A gegen Stimulatorzellen von C nicht unterdrücken. Auch die von A selbst generierten Lymphozyten können dies nicht. Dagegen können die von B generierten Monozyten (nach Kultivierung mit M-CSF und Stimulation mit γ -IFN) die T-Zellproliferation eines Responders A signifikant inhibieren. Auch die von A selbst generierten TAIZ können diese Suppression in Kultur einleiten und damit autologe T-Zellen inhibieren (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuch wurde dann durch Immunisierung von Mäusen mit humanen TAIZ, die wie in Beispiel 1 beschrieben

hergestellt wurden, ein Antikörper (GM-7) generiert, der spezifisch an ein Antigen bindet, das nur auf CD14-Zellen exprimiert wird, die der 6-tägigen ex-situ Modifikation mit M-CSF und 2-tägiger γ -IFN Stimulation unterworfen wurden.

Figur 1 zeigt die in der Durchflußzytometrie ermittelte Bindungsfähigkeit von GM-7 an monozytäre Zellen nach in vitro Modifikation. Es läßt sich erkennen, daß die direkt aus Buffy-coat gewonnenen CD14-positiven Monozyten den Antikörper GM-7 nicht binden (die grau unterlegte Wolke ist Deckungsgleich mit der Antikörperkontrolle). Dagegen exprimieren ein Teil der Monozyten nach Kultivierung in M-CSF und Stimulation mit γ -IFN ein Antigen, welches vom monoklonalen GM-7 Antikörper erkannt wird.

Es konnte gezeigt werden, daß die nach M-CSF-Behandlung und γ -IFN-Stimulation generierte CD14⁺ Zellpopulation in Abhängigkeit vom eingesetzten Medium unterschiedliche Mengen an Monozyten enthält, die den monoklonalen Antikörper GM-7 bindet (siehe Tabelle 2).

	FCS	AMI-Serum	X-vivo	ohne Serumanteil
GM-7 ⁺	82,2±3,8%	89,1±4,5%	67,7±8,9%	65,4±4,9%
GM-7 ⁻	16,3±5,3%	9,8±2,5%	29,4±6,5%	31,2±6,2%

Tabelle 2: Bei der Präparation der Monozyten aus dem Buffy-coat wurde entweder FCS eingesetzt, wie im Beispiel 2 beschrieben, oder analog 50 ml AMI-Serum, 50 ml X-vivo Serum, oder ganz auf Serum verzichtet

Aufgrund dieser Daten wurde dann in einem weiteren Ansatz die Suppressoraktivität der CD14⁺/GM-7⁺ Zellen mit denen der CD14⁺/GM-7⁻-Zellen in der MLC verglichen. Wie Figur 7C zeigt, findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den GM-7-positiven und nicht positiven Zellen. Nur die GM-7-positive Fraktion innerhalb der CD14-positiven Monozyten (nach 6-tägiger

M-CSF-Behandlung und 2-tägiger γ -IFN-Stimulation) übt einen signifikanten Inhibitionseffekt auf die T-Zellproliferationsaktivität von Responderzellen A nach Stimulation mit Zellen von C aus. Im Beispiel sind die präparierten Monozyten von einem Individuum B. Die autologen Monozyten von A verhalten sich analog, da nur GM-7⁺ Zellen von A die Inhibition autologer T-Zellen verursachen (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten sprechen dafür, daß für klinische Zwecke durch die Verfügbarkeit des monoklonalen Antikörpers GM-7 eine homogene Zellpopulation mit optimaler Suppressorfunktion aus den Ursprungsmonozyten nach Kultivierung mit M-CSF und γ -IFN-Stimulation isoliert werden kann.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen monozytären Ursprungs, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) Monozyten aus Blut isoliert;
 - b) die Monozyten in einem geeigneten Kulturmedium vermehrt, welches einen zellulären Wachstumsfaktor enthält;
 - c) die Monozyten gleichzeitig mit oder im Anschluß an Stufe b) in einem γ -IFN enthaltenden Kulturmedium kultiviert; und
 - d) die in Stufe c) gebildeten Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen gewinnt, indem man die Zellen von dem Kulturmedium abtrennt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Monozyten humanen Ursprungs verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man im Anschluß an die Stufen c) oder d) die Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen durch Bindung an den von der Hybridomzelllinie DSM ACC2542 produzierten Antikörper selektiert.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe b) als zellulären Wachstumsfaktor M-CSF verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die M-CSF Konzentration im Kulturmedium 2 bis 20 $\mu\text{g/l}$ beträgt.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Monozyten im Anschluß an Stufe b) 24 bis 72 Stunden lang in einem γ -IFN enthaltenden Kulturmedium kultiert, wobei man die Kultivierung in Gegenwart von γ -IFN 3 bis 6 Tage nach Beginn der Kultivierungsstufe b) beginnt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die γ -IFN-Konzentration im Kulturmedium 0,1 bis 20 ng/ml beträgt.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtdauer der Kultivierung in den Stufen b) und c) 4 bis 8 Tage beträgt.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen im Anschluß an Stufe d) in einem geeigneten Zellkulturmedium oder in einer PBS- oder NaCl-Lösung suspendiert.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen in einem Einfriermedium suspendiert und anschließend tiefgefriert.
11. Verfahren nach den Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Einfriermedium fötales Kälberserum (FCS) und DMSO umfasst.
12. Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen monozytären Ursprungs.
13. Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen nach Anspruch 12, erhältlich nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 11.
14. Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen nach den Ansprüchen 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie humangen Ursprungs sind.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend die Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen nach den Ansprüchen 12 bis 14.
16. Verwendung der Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen nach den Ansprüchen 12 bis 14 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate zur Suppression von Transplantat-Abstoßungsreaktionen.
17. Antikörper produzierende Hybridomazelllinie DSM ACC2542.
18. Antikörper, von der Hybridomazelllinie DSM ACC2542 produziert.
19. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 18 zum Nachweis und/oder zur Selektion von Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen monozytären Ursprungs, sowie deren Herstellung, und deren Verwendung zur Erzeugung von Transplantat-Akzeptanz. Die Erfindung betrifft ferner den monoklonalen Antikörper GM-7, der spezifisch erfindungsgemäße humane Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen erkennt. Die Erfindung betrifft außerdem die Verwendung des Antikörpers GM-7 zum Nachweis und/oder zur Selektion von Transplantat-Akzeptanz induzierenden Zellen.

Fig. 1

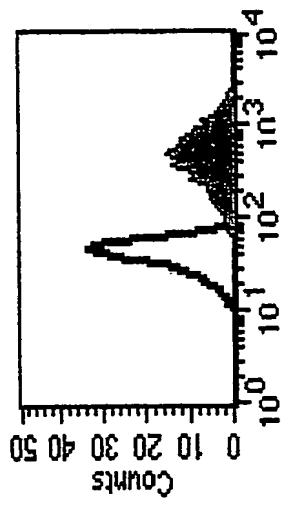
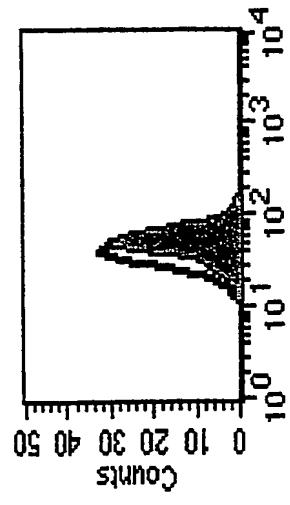


Fig. 2A

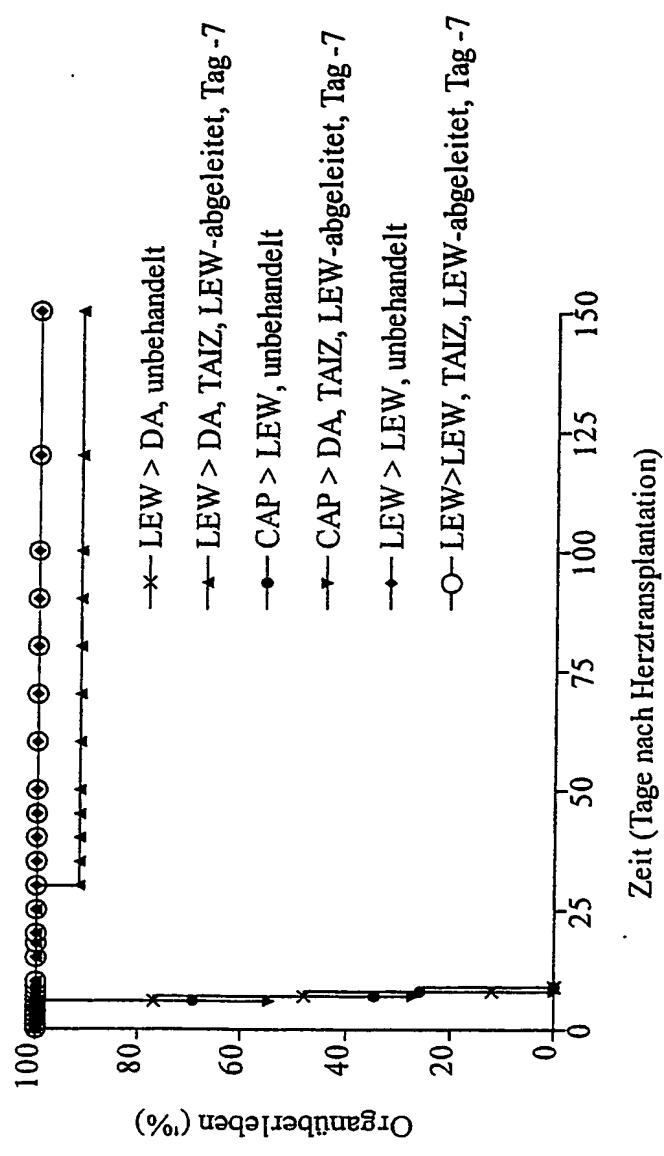


Fig. 2B

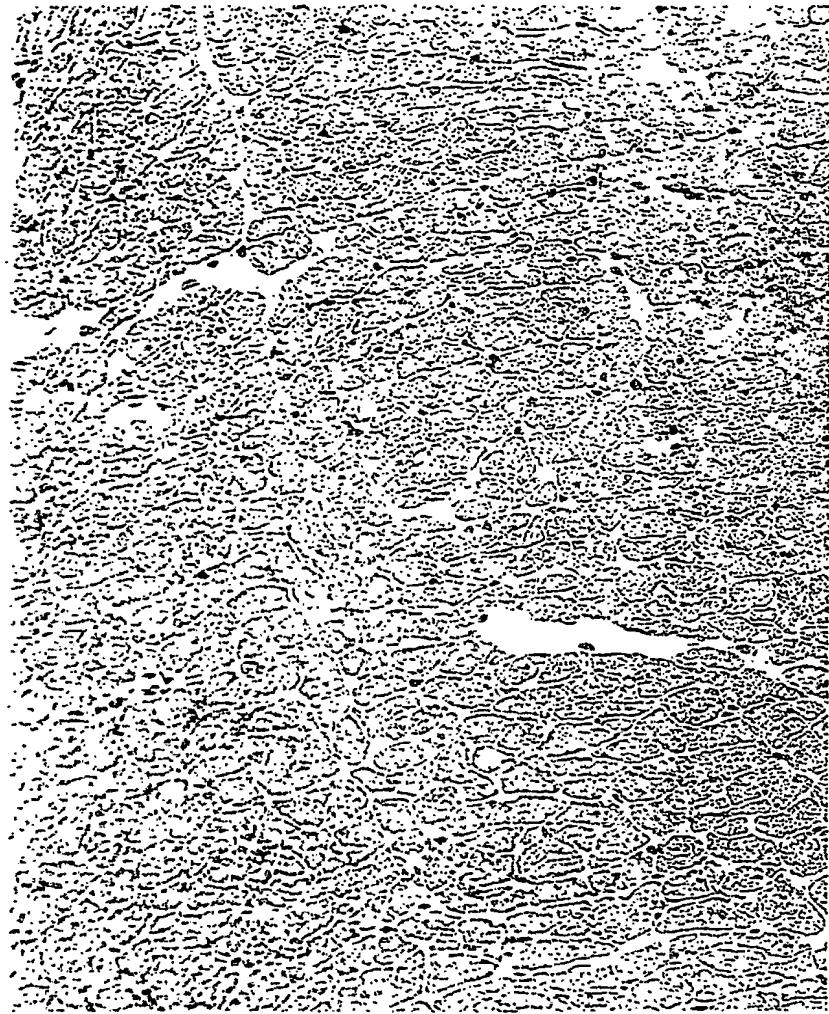


Fig. 2C

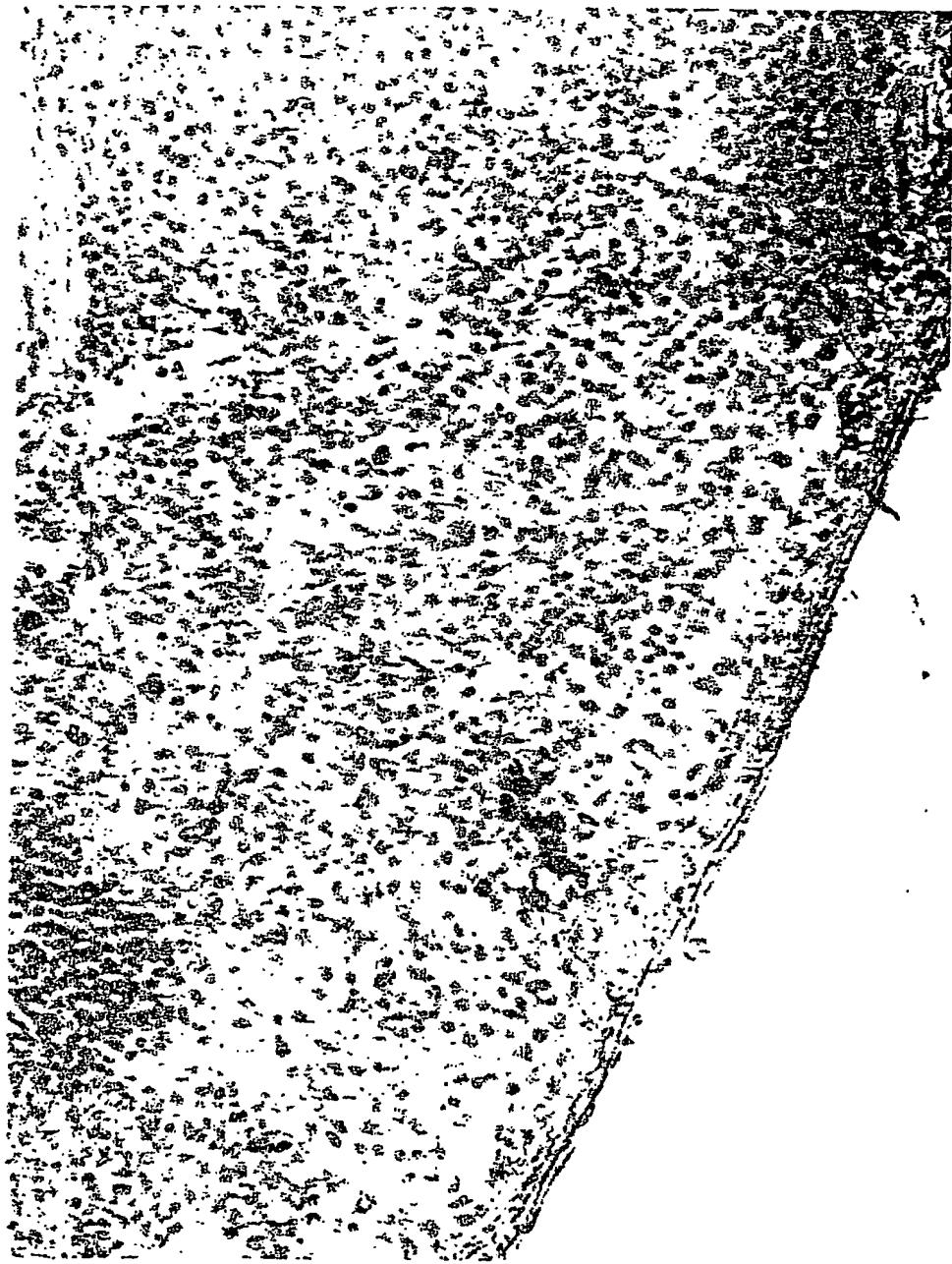


Fig. 2D

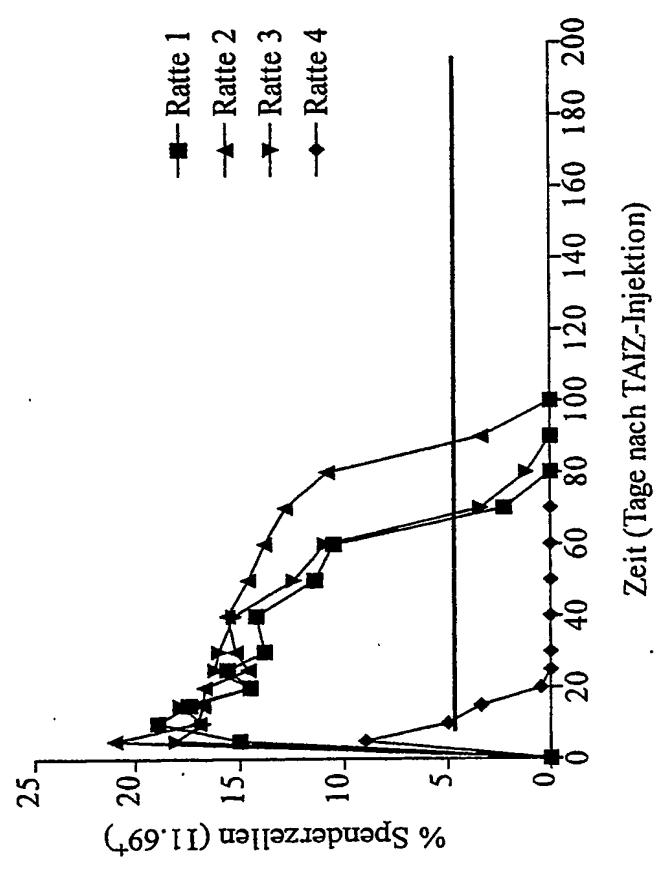


Fig. 3

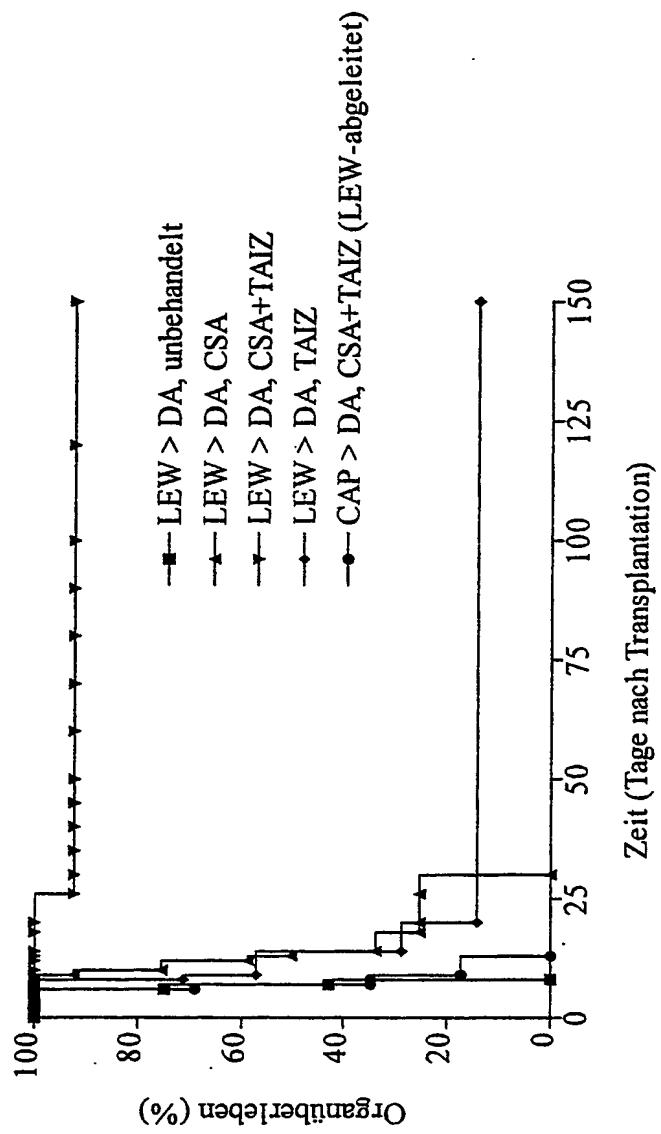


Fig. 4A

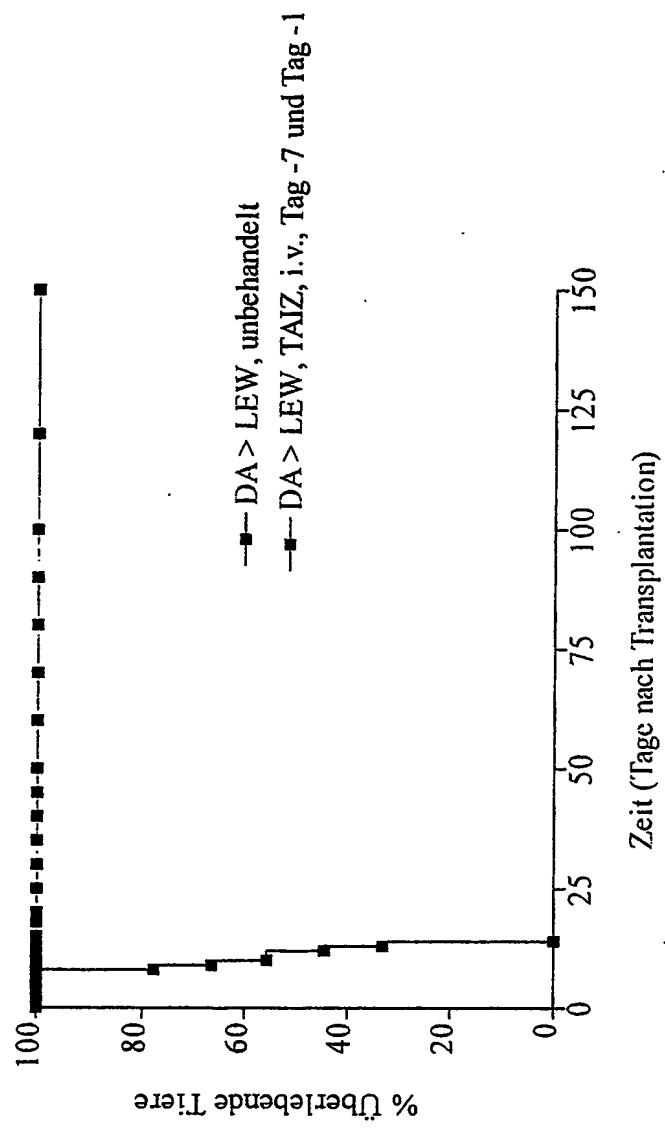


Fig. 4B

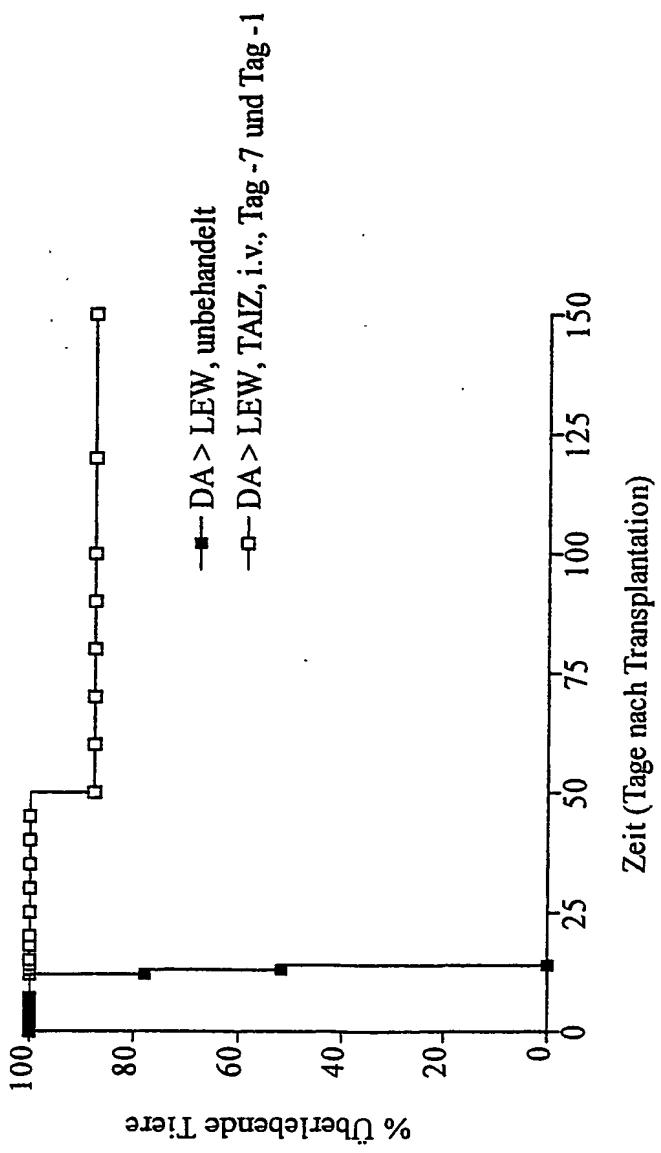


Fig. 4C

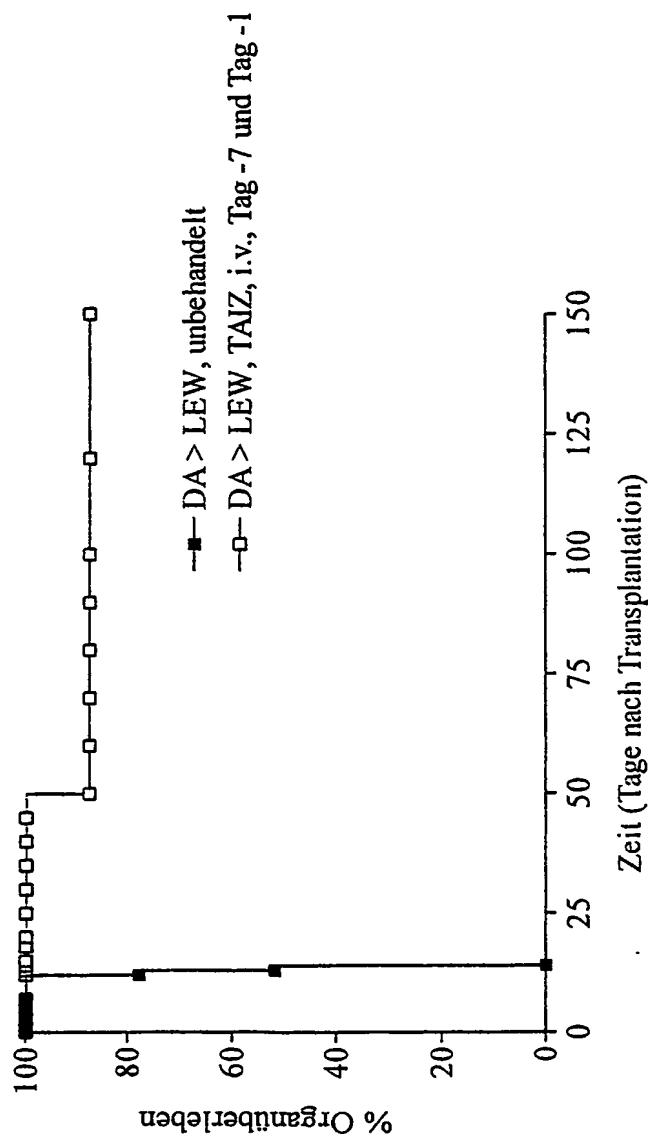
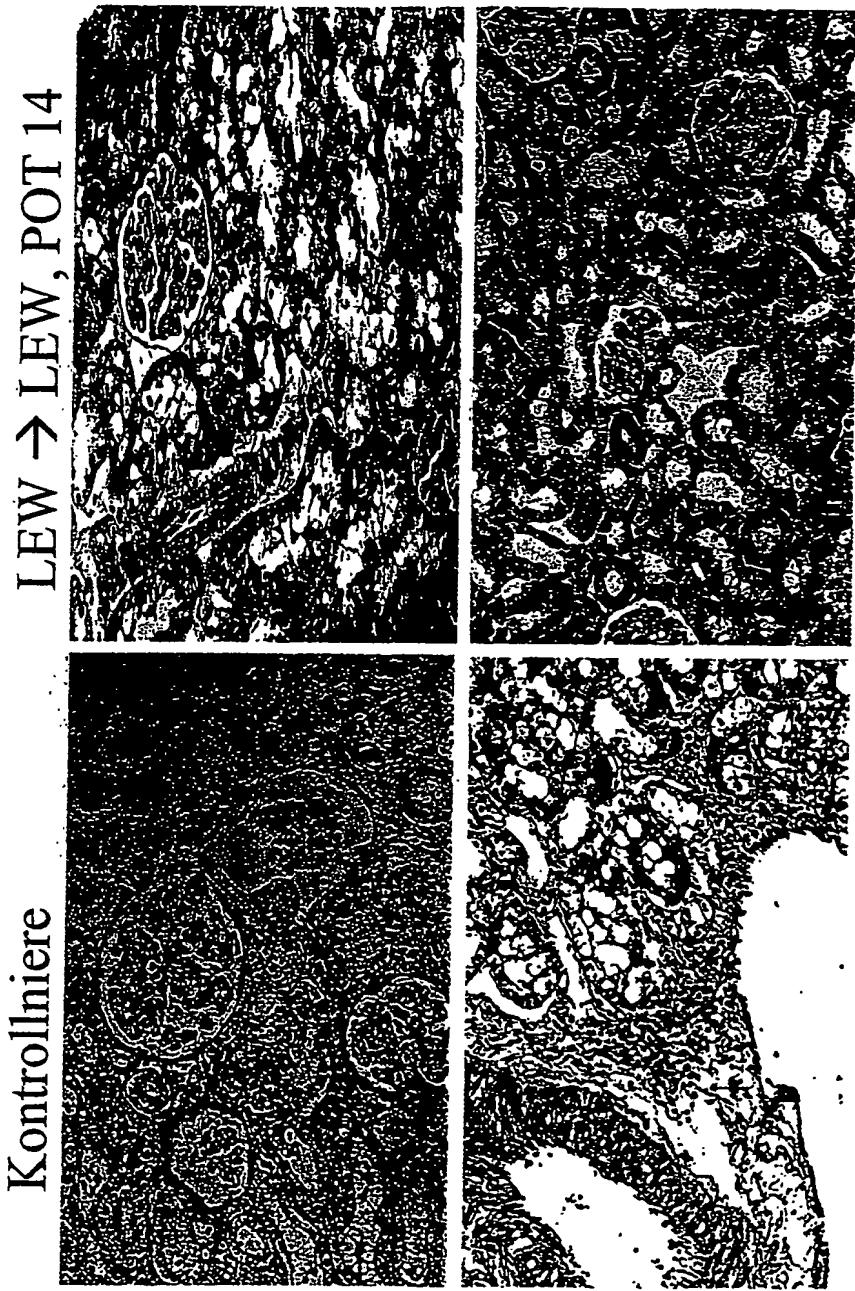


Abb. 4D



DA → LEW, unbehandelt, POT 14 TAIZ-behandelt, POT 14

Fig. 4E

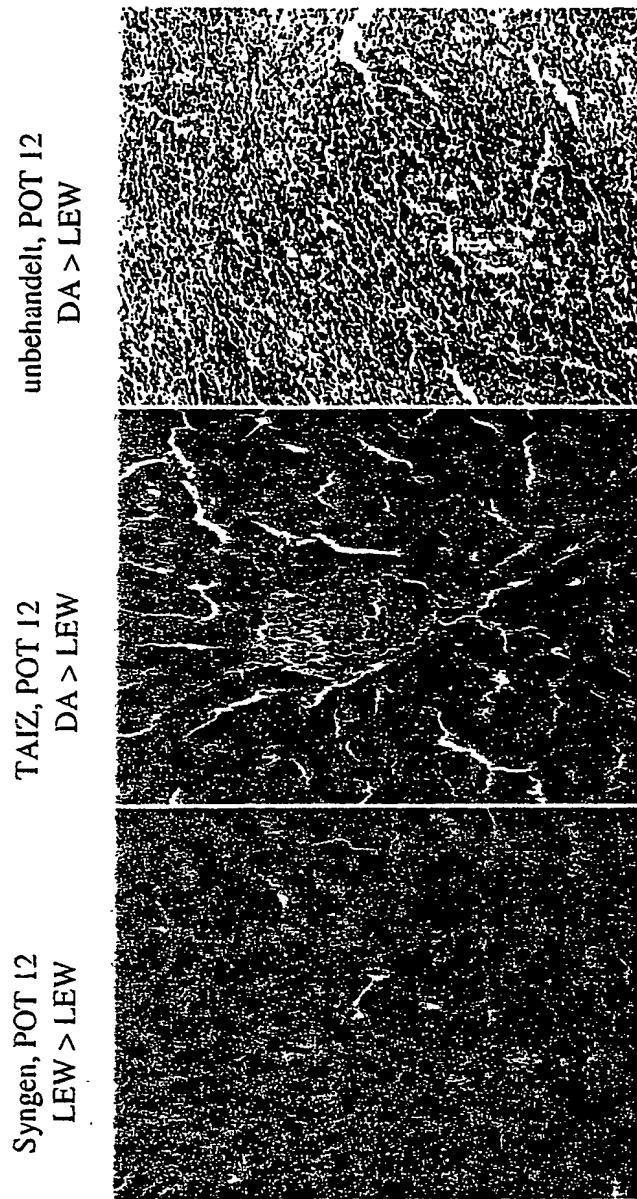


Abb. 4F



Fig. 5A

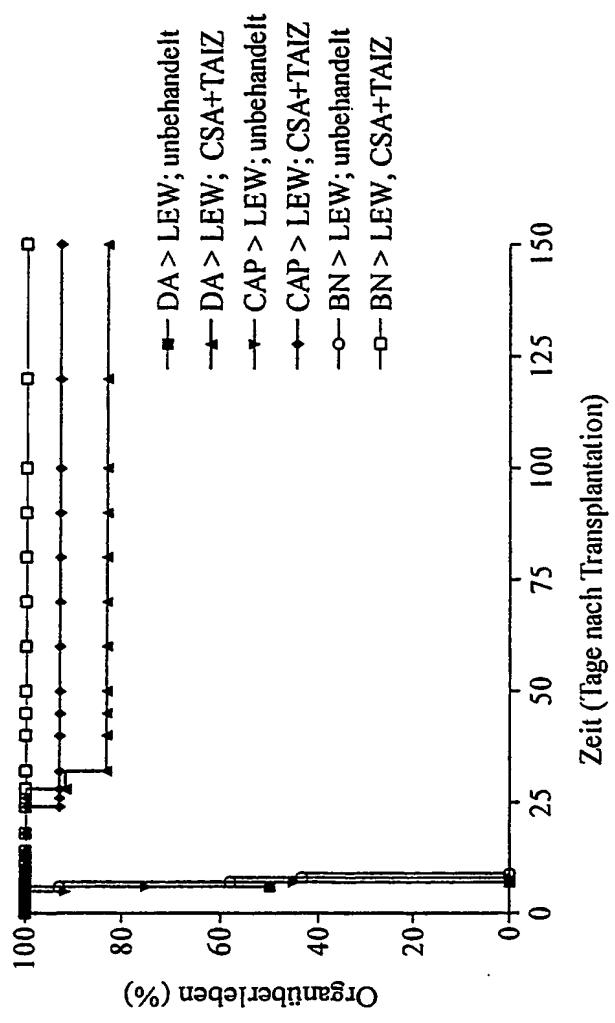


Fig. 5B

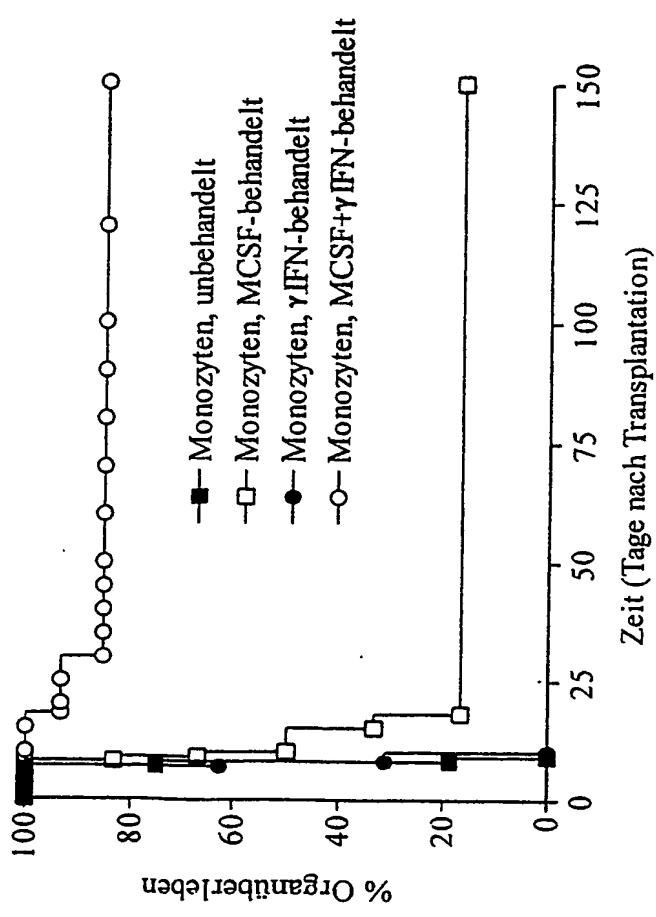


Fig. 6A

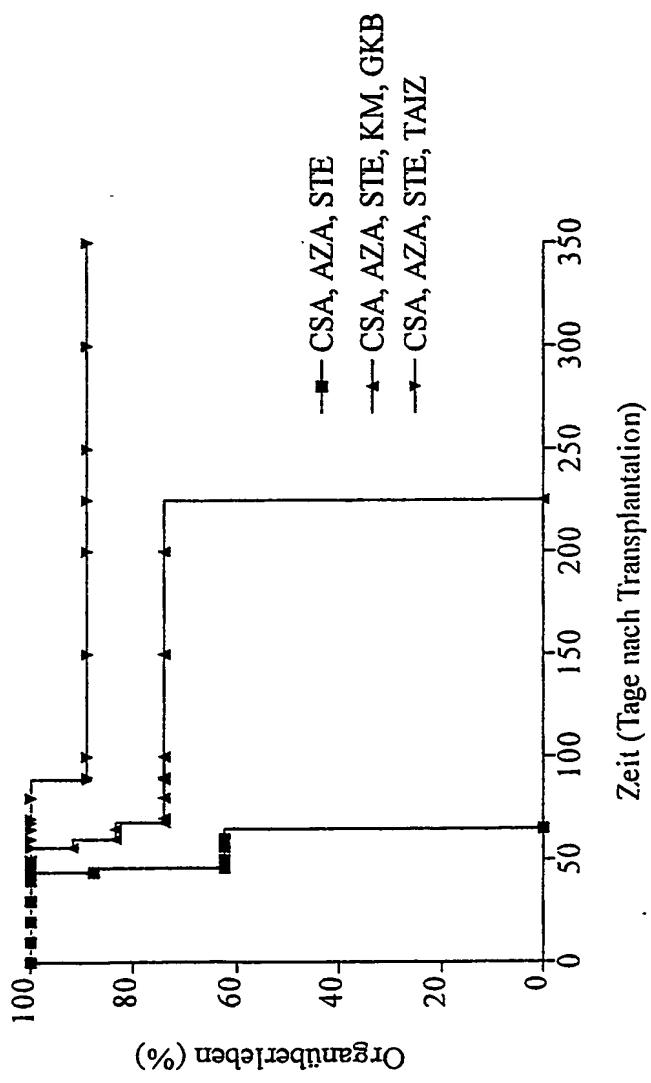
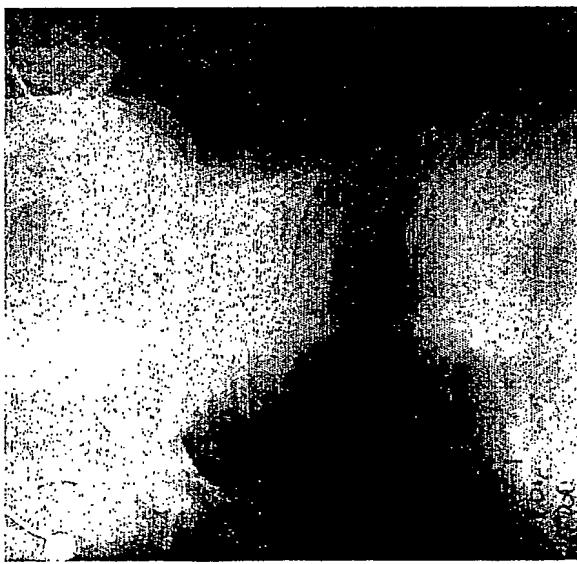
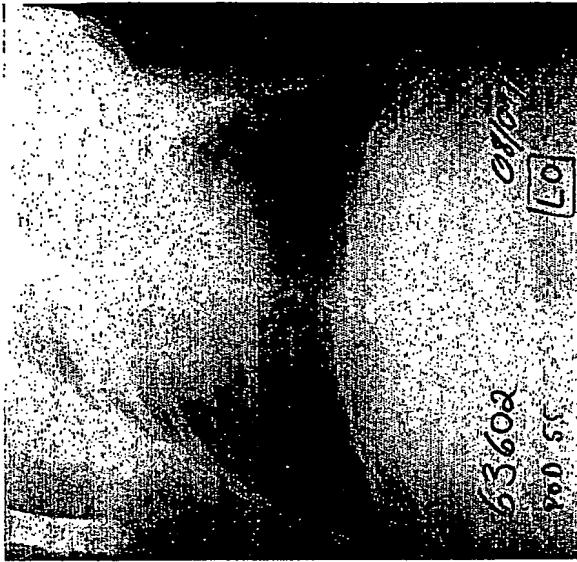


Fig. 6B

unbehandelt, POT 41



TAIZ-behandelt, POT 55



Figur 7A

Responder-Zellen von A : Stimulator-Zellen von C

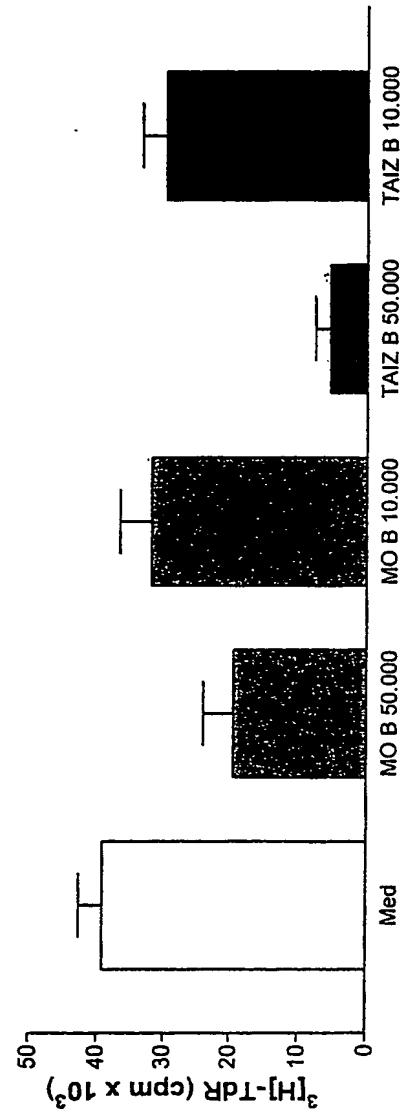


Figure 7B

Responder A : Stimulator C

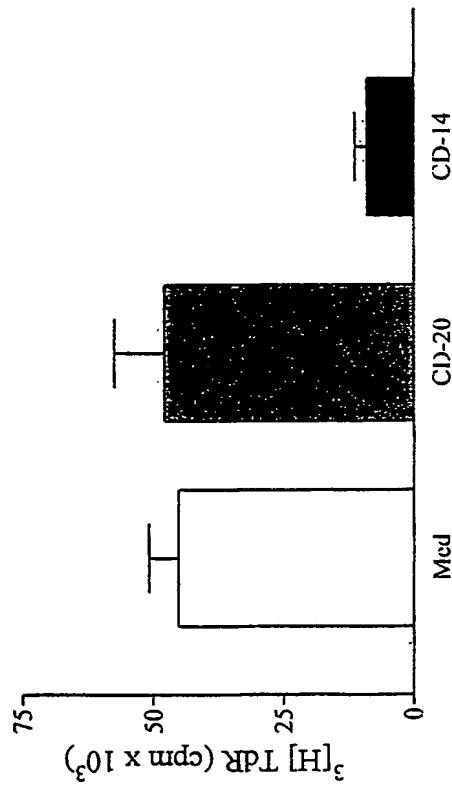
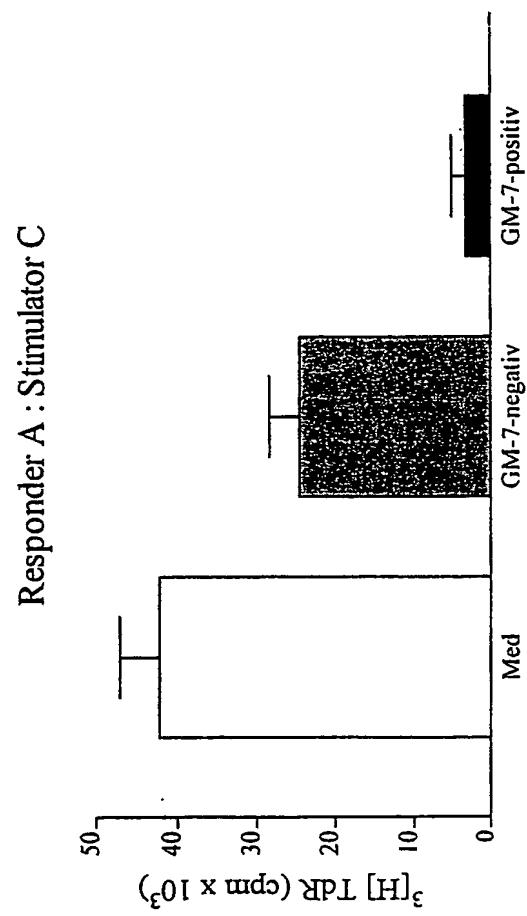


Fig. 7C



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.